

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



**Caracterización de las bases genéticas y moleculares de dos
nuevos síndromes asociados a alteraciones del desarrollo**

-TESIS DOCTORAL-

Memoria para optar al grado de
Doctora en Biociencias Moleculares:

Elisa Fernández Núñez

Licenciada en Biología

Director de Tesis:

Víctor L. Ruiz Pérez

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC)

A Roberto

A mis hijos

A mis padres

A Patricia,

la estrella que más brilla desde el cielo.

*“Es la calidad de las convicciones
y no el número de seguidores
lo que determina el éxito”*

Harry Potter y las Reliquias de la Muerte

*This ain't a song for the broken-hearted
No silent prayer for the faith-departed
I ain't gonna be just a face in the crowd
You're gonna hear my voice
When I shout it out loud*

*It's my life
It's now or never
I ain't gonna live forever
I just want to live while I'm alive
(It's my life)
My heart is like an open highway
Like Frankie said
I did it my way
I just want to live while I'm alive
It's my life*

*This is for the ones who stood their ground
It's for Tommy and Gina who never backed down
Tomorrow's getting harder, make no mistake
Luck ain't enough
You've got to make your own breaks*

*It's my life
And it's now or never
I ain't gonna live forever
I just want to live while I'm alive
(It's my life)
My heart is like an open highway
Like Frankie said
I did it my way
I just want to live while I'm alive
It's my life*

*You better stand tall when they're calling you out
Don't bend, don't break, baby, don't back down*

*It's my life
And it's now or never
I ain't gonna live forever
I just want to live while I'm alive
(It's my life)
My heart is like an open highway
Like Frankie said
I did it my way
I just want to live while I'm alive
(It's my life)*

"It's My Life"
Bon Jovi. Disco Crush



AGRADECIMIENTOS

Hace justamente 10 años ocurrió un acontecimiento por el que, por desgracia, pasan muchas personas que deciden dedicarse al mundo de la investigación, y lloré mucho pensando que jamás escribiría estas páginas que, para mi, son tan importantes como todo lo demás que ocupa este volumen. Sin embargo, el esfuerzo y el tesón, no solo mío, ha hecho que aquí esté, delante del ordenador, también con alguna lagrimilla suelta, dispuesta a dar las gracias a todas las personas que me han acompañado en este largo camino.

En primer lugar, quería dar las gracias a Víctor por haberme dado la oportunidad de retomar los estudios de doctorado y realizar esta tesis. Han sido unos años intensos, de mucho trabajo, de muchas vicisitudes, pero, en mi opinión, con un gran resultado. Gracias por ser una persona crítica, con gran rigurosidad científica y tan perfeccionista. Es de agradecer contar con una persona que piensa como yo en la manera de hacer las cosas. Como ya hemos hablado en más de una ocasión, “para hacerlo mal, mejor no se hace”.

Y como la ciencia no se hace sola, sino que se hace en equipo, quiero dar las gracias también a todas las personas ajenas al laboratorio 1.8 del IIBM que han participado en este proyecto. Las Profesoras Mona Aglan, Samia Temtamy y la Dra. Ghada A. Otafy de Egipto; los Drs. Denise Horn y Felix Boschman de Alemania, la Dra. Grace Yoon y su equipo de Canadá, los Drs. Pablo Lapunzina y Julián Nevado del INGEMM, los Drs. Raquel Largo, Gabriel Herrero-Beaumont y Ana Lamuedra de la FJD, el Dr. Javier Regadera de la UAM y Dña. Isabel Esteban de La Paz.

En tercer lugar, quiero agradecer a todo el personal técnico, de gestión, de mantenimiento y limpieza que forman parte de los servicios centrales del IIBM, porque sin ellos y sin ellas no podrían salir adelante ninguna tesis doctoral ni ningún proyecto de investigación. En muchas ocasiones se olvida nombrarles o se hace muy por encima. Parece que tienen que estar ahí, realizar su trabajo y ya está, que por eso forman parte de los servicios técnicos. Además de darles las gracias, quiero hacer visible que sin su labor y profesionalidad la rueda de la ciencia no giraría, porque la I+D+i no está conformada únicamente por personal investigador y eso es algo que aún no han logrado ver muchas personas, tanto de dentro como de fuera de este ámbito. Por ello, muchas gracias a Rafa, Ángel, José Antonio y Ramón del servicio de mantenimiento, por las veces que he bajado a que arregléis cualquier cosilla o me fabriqueís algo. Al personal de limpieza, en especial Carmen y Vicky que son las que he tenido más cerca. A Sergio, María Jesús, José Luis y Mati del servicio de almacén, por la cantidad de tiempo que nos ahorráis con los pedidos. A Santos por la gestión de residuos, algo imprescindible en un centro de biomedicina. A Teresa, Raquel, Patricia y Carolina del servicio de protección radiológica, por los meses que estuvimos juntas y todo lo que aprendí allí. No pensé que me volvería a congraciarse con la física de partículas. A todo el personal del animalario, David y Marta, Carlos, Raquel, las dos Marías, Cristina, Leti, Coral, Miguel Ángel, Manolo, Álvaro, y en especial a Natalia y Graci por cuidar tan bien de nuestras colonias de ratones. A Yolanda, del servicio de histología. A Mercedes, M^a Carmen y Magnolia del servicio de cultivos celulares, porque sin vuestro gran trabajo nos comerían las contaminaciones por micoplasma. A los dos componentes del servicio de imagen científica. A Javi por el diseño tan maravilloso de portada que ha elaborado para esta tesis doctoral y a Silvia, por las sesiones de fotos que hemos realizado y por el mantenimiento tan exhaustivo de la máquina de revelado. A Carmen, Rosa, Raquel y Gema del servicio de medios y esterilización, por llevar a cabo un trabajo tan esencial y primordial para todos los laboratorios y que, si tuviéramos que realizar nosotras y nosotros, tardaríamos el doble en llevar a cabo los experimentos. Al personal del servicio de genómica, Gemma, Conchi, Diana y Miguel, por vuestra profesionalidad en llevar a cabo las solicitudes que os mandamos, así como el inestimable asesoramiento y buena disposición. A Teresa y María del SIERMAC, porque sacáis adelante un servicio altamente especializado y altamente demandado, siempre con una sonrisa y una gran capacidad. Al personal de informática, siempre atentos y dispuestos. Javi Merino, Asun, Alejandro, Antonio (vaya palizas nos metemos en el AVE a diario, tu más que yo), Javi y como no podría faltar, mención especial a Guti, la persona que más información te puede dar en el IIBM y siempre con una sonrisa y una broma. A Mónica, Lucía y María del servicio de microscopía del IIBM, y a Diego, aunque ya no forme parte de él, a José Ángel y Javi del servicio

de microscopía del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo y a Loli del servicio de anatomía patológica del Hospital Universitario de La Paz. El personal de estos tres servicios son un gran ejemplo de implicación, aunque no sea su trabajo. Sin vuestra ayuda y soporte muchas de nosotras y muchos de nosotros estaríamos perdidos. A Paco y Cova del servicio de microscopía electrónica de transmisión de la UAM, una técnica apasionante que me ha dado muchas alegrías durante este trabajo. Al personal de conserjería, Diego y Carlos, que ya no estáis y Adrián y Cristina, por vuestras sonrisas y cariño diario. Por último, que no menos importante, quiero agradecer a todo el personal de gerencia y administración. Isabel, Ricardo Uña, Diana, Adela, Mercedes, José Vicente (espero volver a compartir opiniones y títulos de libros pronto), Paloma, Eva, Estibaliz y Manolo. Vuestra labor esencial hace que el IIBM funcione y nos podamos despreocupar de mucha de la burocracia que existe en el mundo de la investigación. Aunque revisaré estas líneas varias veces para ver si me falta alguna persona, pido perdón si me he dejado a alguien por el camino.

También quiero agradecer a Paloma y Carmen, de la unidad de divulgación científica del CSIC, por contar conmigo, durante 4 años ya, para colaborar en el programa Ciudad Ciencia. Me habéis abierto un mundo maravilloso, que cada vez me gusta más, con el que puedo hacer llegar a la sociedad, no solo el trabajo que hago en el laboratorio, sino también el papel que las mujeres han tenido y siguen teniendo en la investigación.

El siguiente agradecimiento puede resultar un poco extraño, pero es que, en tiempos de pandemia, donde la interacción social se ha visto limitada a las pantallas, he descubierto a un montón de gente maravillosa a través de redes sociales, que me han ayudado, no solo a llevar mejor el tiempo de confinamiento, y a descubrir un mundo de divulgación científica que desconocía, sino también a hacer frente, con mejor talante y buen humor, los últimos meses de esta tesis doctoral. Aunque son muchas y muchos quiero hacer una mención especial a Paula Sanchón (los saraos que no falten), Eduardo Bazo (el mejor friki-botánico-reivindicativo, miembro de la Asociación Utrerana de Juegos de Mesa UtreraJuega), Ginesa Blanco (gracias por esos experimentos caseros para peques), Conchi Lillo (la envidia en temas de vermú de fin de semana), Azucena Martín (el humor y la divulgación no pueden ir por separado), Patricia González-Rodríguez (espero que los revisores en Nature digan ya que sí y con ese pelotazo puedas volverte pronto de EE.UU, y con plaza fija), Cheyenne (otra toledana que va en AVE a diario a “hacer la ciencia”, que ya sabemos que no se hace sola), Helena y @sassyscience_ (gran labor en la visibilización del colectivo LGTBIQ+ en ciencia), Miguel Ángel (gracias por esas conversaciones de lo dura que es la tesis y la gran labor divulgativa que estas empezando a hacer, me encantó verte cantar a la anosmia) y Lidia (devuélvenos a mini yoda). Espero que muchos y muchas podamos desvirtualizarnos pronto y celebremos esta tesis doctoral, y otras muchas cosas, por todo lo alto (y con tutús).

A mi otra familia profesional, la sindical y reivindicativa. A mis compis del SAE Estatal, por vuestra gran acogida y vuestro apoyo en estos últimos meses de escritura. Muchas gracias a la gente de Zorrilla, Julia, Carolina, Luis, Juanma y sobre todo a Jose, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de este gran equipo de personas, y a Julián y Javi, por vuestra ayuda en todo momento, solucionándome mil dudas (muchas ni siquiera para mí) y dándome soporte. Deseando estoy de poder veros más allá de la pantalla. Pero, sobre todo, un gracias muy especial a la ejecutiva ampliada de la mejor Sección Sindical Estatal que tiene Comisiones Obreras, la del CSIC. A Herminio, Dani, José Miguel, Anna (te echamos de menos), Manolo, Neuss, Fuen, Marta (¡¡jefa!!), Maribel, Carlos Cuellar, Paco, Fernando, Jorge, Ricardo y sobre todo Alicia y Javi, por vuestros ánimos, por vuestros “*Contigo donde haga falta*” o “*Eli, déjate de sindicalismo y ponte a escribir*” y por vuestra visión del mundo de la ciencia, diferente en cada persona, pero con una parte común muy importante, la de la lucha de clases. Discutimos mucho, pero nos queremos más. Sois los mejores y las mejores y, ojalá, el personal de investigación español, y particularmente del CSIC, fuera consciente del trabajazo que lleváis a vuestras espaldas para que todos y todas tengamos las mejores condiciones laborales que pueda haber. A continuar con la lucha, en las mesas o en las calles, porque si algo tenemos claro en esta

sección no es que Sin Ciencia No Hay Futuro, es que Sin Derechos Tampoco Hay Ciencia, y como dijo el gran Marcelino Camacho, “Ni nos domaron, ni nos doblaron, ni nos van a domesticar”.

A mis compañeros de labo, a los que ya no están, a los que han pasado por allí de manera fugaz y a los que siguen. Aunque me he sentido como la madre de algunos de ellos (sí, Juan, esto va por ti), tengo que reconocer que ellas y ellos también me han cuidado mucho, y sin su apoyo esta tesis no habría podido salir adelante. A Lucía Calatrava, pasamos poquito tiempo juntas (un mes) pero vi que eres una gran persona. Lucía Chico, mi primera TFG y un gran torbellino de persona. Carol, cuánto me alegro que al final tomaras otra vía profesional. Patri, recuerda, siempre positiva, nunca negativa. Roberto, has llegado con la pandemia, pero que bueno que llegaste. Por cierto, quiero una acuarela tuya y firmada de regalo de tesis. Ricardo, mi chico drama, el que mejor posa para Instagram y al que espero que todo le vaya maravillosamente bien. Ana, el último reducto sin acento que queda en el 1.8. Mantente firme, o terminareis todas y todos hablando andaluz. Juan, (¡¡¡ay, mi Juanillo!!!), ¿qué te digo a ti? Que eres lo más “salao” que hay en el IIBM, que llegaste en un momento de mucho estrés y no supe darte la bienvenida que te merecías, pero que espero que haya podido compensar después y que, pese a lo “desastre” que eres (dicho con todo el amor de madre del mundo), no puede haber un compi de laboratorio y amigo mejor, porque tienes el corazón más grande de Córdoba. Adri, el primero que conocí en el 1.3.1. Eras un yogurín de TFM cuando yo llegué al labo y he visto cómo has ido creciendo, como persona y como profesional. Tienes un humor fantástico, que sabes que yo no logro pillar y por eso te ríes tanto de mí. Pero también eres una persona muy trabajadora y muy leal, que se merece una gran carrera profesional. Con todo por lo que has pasado ya, llegarás donde te propongas, no lo dudes. Y Cris, ahora mismo me tienes riendo y llorando a la vez, porque hay muchas cosas que quiero dejarte aquí escritas, pero lo único que me viene a la cabeza es el video que me mandaste anoche. Eres la mejor compañera de trabajo que he tenido nunca. Hemos sido un equipo real, al 50% en todo, algo muy difícil de encontrar en un ámbito tan competitivo como es el de la investigación. Muchas gracias por decirme, “*adelante, tienes todo mi apoyo*” cuando te pedí opinión acerca de volver a hacer la tesis, por tus reflexiones, por tus risas y ocurrencias locas, y sobre todo por tu fuerza y por encontrar siempre una visión positiva para todo. Eres un gran ejemplo a seguir. La ciencia ha perdido, no solo una gran investigadora, sino también una gran persona en sus filas. Sin embargo, se me encoje el alma de alegría cuando veo cómo se te iluminan los ojos de felicidad cuando hablas de tu nueva vida.

Pero no todo se reduce al laboratorio. También hay gente maravillosa con la que solo interaccionas en los pasillos, en la sala de personal o en las mesitas de fuera. Mis queridos “Pistachos”, porque, aunque siempre he sido la que menos ha socializado por temas de distancia y conciliación, me habéis hecho sentir una más del grupo. Nacho, Raquel, Irene, Darío, Jone, Raquel, Natalia, Laura, Belén y Ana, un abrazo muy fuerte. José Ángel, toledano mío, la cantidad de risas, torrijas y croquetas que nos hemos perdido en estos años. Carmen Grijota, eres una persona genial, espero que a partir de ahora solo lleguen cosas buenas. Mi querida Lisset, eres un ejemplo de tenacidad laboral, espero que dentro de muy poco consigas el puesto por el que tanto has luchado y que te mereces.

Quiero dar un gracias muy especial a Alberto Becerro, un gran amigo, que hace 10 años no miró para otro lado e hizo todo lo posible para que pudiera seguir trabajando en ciencia. Por conseguir esas cañas con un amigo, que hicieron que me pudiera incorporar a un gran equipo de investigación, el de la Red Española de Mastocitosis. Por desgracia, los recortes de aquella época hicieron que solo pudiera formar parte de ese grupo un año, pero siempre os llevaré en mi corazón. No solo porque me hicisteis volver a recuperar la ilusión por la investigación, sino que además con vosotros pude ver y aprender la parte humana de la investigación clínica. Muchas gracias a Luis Escribano y Alberto Orfao por esa oportunidad y a Iván, Almudena, Laura, Rosa, Laurita, Elena, Bea y Mario por compartir conmigo esos meses.

Y como en la vida hay más cosas que el trabajo, o al menos así debería ser, también tengo que agradecer a todas las personas que tengo en mi vida fuera de él. Algunas desde hace ya muchos años. A mis chicas, porque siempre me habéis entendido o al menos lo habéis intentado. Paula, mi guarri, mi amiga más antigua, más de 25 años juntas y sumando. Somos como el agua y el aceite, cualquiera que nos vea no se podrá creer que nos hemos criado juntas, pero en cuanto nos necesitamos la una a la otra, allí estamos. Este es nuestro año para que la cosas empiecen a ir bien, ya lo verás. A Mari, también muchos años juntas, desde la pandilla de secundaria. Porque siempre te has alegrado por mí en las cosas buenas y en las malas me has preguntado “¿A quién hay que pegar?”. Espero que podamos volver pronto a nuestras tardes de piscina y nuestros viajes a la playa solas, bueno, quien dice solas, dice acompañadas de 5 peques (con Alex ya serán 6, así que nos tocará llevar dos coches). A mis frikis, Elena y Natacha, porque nuestra amistad comenzó gracias a la ciencia y se ha mantenido a pesar de la ciencia. Muchas gracias por vuestro apoyo y consejos hace 10 años y durante estos últimos 10 años. Natachi, lo prometido es deuda, muchas gracias por la corrección del inglés en el abstract de esta tesis, sacando tiempo de una docencia semipresencial de locura para hacerme casito. A Esther, mi Picó, la mayor de las chicas farolillo y a la que tengo que agradecer, no solo tu apoyo y tu amistad a lo largo de todos estos años, sino también la insistencia en que me presentara contigo a las plazas de Titulado Superior del CSIC en el año 2012. Por tu perseverancia, apoyo, y nuestro temario a medias y simulacros de examen por Skype, conseguí una plaza que me cambió la vida, con la injusticia de que tú te quedaste fuera, solamente porque había que elegir localidad antes del examen. La ciencia te debe mucho y también ha perdido mucho al expulsarte de sus filas. A mis pollejas, la rubia y la morena. Son muchos años juntas, con muchas cosas buenas y también, por desgracia, con demasiadas cosas malas, pero que con vuestra forma de ser y vuestra fuerza se han podido capear de una forma u otra. Tenemos otro viajecito pendiente como el de Roma (“Prego!”) y otra salida de fiesta por el “Medias Puri”. Winnie, deseando estoy que vuelvas de Manchester, de que mis peques tengan a su tía Angélica cerca y poder achucharte. Eres una profesional como la copa de un pino y eso no lo tienes que dudar nunca. Sarita, mi norieña intensa que luego eres más dulce que los maravillosos postres que haces. Espero que la vida te deje ya un poquito tranquila y la puedas disfrutar. A todas, os quiero, gracias por estar siempre ahí.

Gracias también a mi familia. A Conchita y Pablo, por cuidarnos como lo hacéis. Por aguantar mi mal humor y mis dotes de ordeno y mando. Porque sé que daríais todo lo que tenéis por nosotros y así lo habéis demostrado en varias ocasiones.

A mis sobrinos. Helena, gracias por ser tan especial, por tus locuras, tus sonrisas y tu inocencia. Por favor, confía en ti y, aunque sé que no te va a hacer gracia lo que te voy a decir, también en lo que te digan tus padres, que solo lo dicen por tu bien. Pablito, mi adolescente, que eres más hijo que sobrino. Has crecido a mi lado, te he regañado mucho, sobre todo este último año al pasar el confinamiento juntos, pero me siento muy orgullosa del “adulto” en el que te estas convirtiendo. Me encanta ver que nos buscas a tu tío y a mi cuando necesitas ayuda y me alegra que nos tengas como referentes en tu vida. Espero que dentro de poco los paseos en moto me los des tú, en vez de tu tío.

A mi hermana, por estar ahí siempre. Porque, aunque a veces discutimos y tenemos gustos diferentes, sabemos que podemos contar la una con la otra para lo importante. Te metes mucho conmigo por ser funcionaria, pero sé que estas muy orgullosa de mí, al igual que yo de ti. A Alfredo, por cuidarlas a ella y a Helena y tratarlas como reinas, que es lo que son. Espero que me dejes dar una vuelta en tu maravilloso coche nuevo como regalo de tesis.

Quiero dar las gracias especialmente a mis padres, por inculcarme los valores por los que se rige mi vida. Por vuestro tiempo y por vuestro apoyo. Por vuestra lucha diaria en sacar adelante nuestra familia. Por vuestras horas de ocuparos de mis hijos mientras yo estoy trabajando. Por enseñarme desde pequeña lo que es la conciencia de barrio y de clase, y que siempre hay que esforzarse por las cosas que quieres conseguir, pero

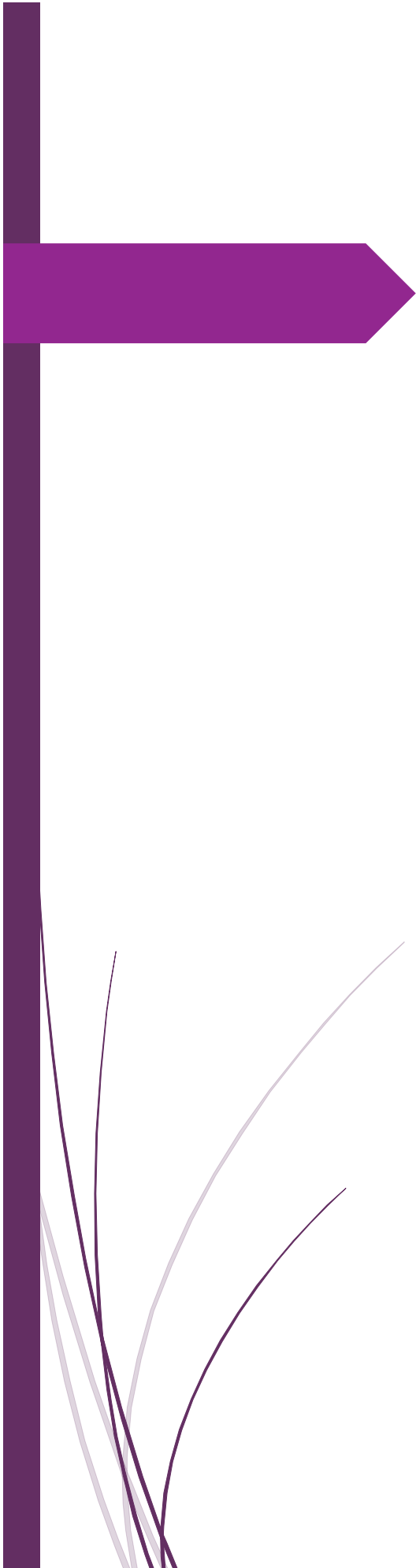
sin dañar a nadie por el camino, y que no necesitamos que nos regalen nada porque con esfuerzo todo se consigue. No he querido que supierais que estaba haciendo la tesis porque no quería que sufrierais de nuevo por mí, porque soy muy consciente de lo mal que lo pasasteis hace 10 años, sobre todo tu papá. Aunque últimamente me has dicho mucho que estás muy orgulloso de tus hijas, quiero que sepáis que la que se siente orgullosa de padres soy yo.

A mis hijos Roberto y Adrián. La luz de mi vida. Costó que llegais, pero luego vinisteis seguidos y habéis revolucionado nuestra existencia. Gracias por estar ahí, con vuestra sonrisa siempre. Por iluminar las mañanas con un beso y un *“buenos días mamá”*. Por vuestras divertidas ocurrencias y travesuras, aunque a veces desespere con ellas. Por hacer que nos esforcemos en ser mejores personas para que vosotros nos miréis con orgullo. Gracias por aguantar el *“deja a mamá un poquito que está trabajando”* y no quejaros por haberos robado muchas horas de estar junto a vosotros. Gracias por vuestra forma de ser tan diferente y tan especial que tenéis cada uno. Espero que seáis lo que queráis ser, sin dañar a nadie por el camino y sin que nadie os dañe a vosotros.

Y a ti, Roberto, mi compañero de vida desde hace 20 años. Tengo mucho que agradecerte en todo este tiempo, pero, sobre todo, que en todas las decisiones que he tomado, acertadas o no, has estado ahí conmigo, apoyándome y consolándome, riendo y llorando a mi lado. No solo me has dado dos hijos preciosos, sino que me has dado una vida a tu lado, que es lo mejor que tengo. Me prometiste que no me aburriría a tu lado, y así ha sido, aunque ha habido momentos en los que nos hubiera encantado aburrirnos. Hemos pasado por cosas malas, demasiadas para lo jóvenes que somos, pero las cosas buenas prevalecen. Gracias por confiar en mí en todo momento y por tirar de mí en los momentos de bajón. Por hacerte cargo de nuestros hijos (Pablito incluido) durante toda la pandemia para que yo pudiera escribir esta tesis. Por todo el tiempo que mi trabajo te ha robado y que nunca te has quejado. Eres el mejor padre y el mejor compañero que una persona puede desear. Te quiero.

Gracias de todo corazón.

Elisa



RESUMEN

La existencia de un diagnóstico certero de una enfermedad es clave para la calidad de vida del paciente. En el caso de las enfermedades raras, la obtención de este diagnóstico puede transformarse en una odisea de varios años, e incluso décadas, que deriva en el retraso de la obtención de un posible tratamiento efectivo, una asistencia adecuada, así como la planificación de la vida familiar. El objetivo de esta tesis consistió en determinar la implicación de variantes genéticas identificadas mediante secuenciación de exoma en *FXR1* y *MAPKAPK5* como causantes de dos enfermedades raras hereditarias de manifestación pediátrica, a través de estudios funcionales en modelos experimentales que permitiesen conocer la patología molecular asociada a estas variantes.

FXR1 codifica una proteína de unión a ARN. Este gen da lugar a 7 isoformas diferentes mediante splicing alternativo, siendo algunas específicas de tejido. En el músculo esquelético y cardíaco solo existen las isoformas e y f, que incorporan un exón 15 exclusivo de estos tejidos. *FXR1* ha sido asociado previamente con defectos en el desarrollo muscular en modelos animales con este gen silenciado, así como letalidad neonatal en ratones knockout constitutivos para todas las isoformas de *Fxr1*. En esta tesis, se estudió la historia natural de la enfermedad resultante de mutaciones recesivas que afectan exclusivamente a las isoformas musculares de *FXR1*, a través de: i) el análisis de dos líneas de ratón con mutaciones en el exón 15 de *Fxr1* generadas por la tecnología CRISPR-Cas9, las cuales desarrollan miopatías no letales que varían en gravedad dependiendo del efecto de cada mutación en la proteína, y ii) el análisis de la expresión y la localización de las proteínas codificadas por *FXR1* en cultivos de mioblastos de un paciente con mutaciones en las isoformas musculares de este gen. El resultado de estos estudios ha demostrado que determinadas mutaciones de *FXR1* dan lugar a isoformas musculares e y f se acumulan en gránulos citoplasmáticos con forma anular en miotubos en cultivo y en fibras musculares. Estos gránulos no son gránulos de estrés ni agresomas, pero conservan la capacidad de unir ARNm. El análisis transcriptómico del músculo esquelético de los ratones con mutaciones en exón 15 de *Fxr1*, demostró la existencia de alteraciones en varias vías de señalización, como las proteínas de la vía de señalización de *p53*, genes proinflamatorios y proapoptóticos, y transcritos correspondientes a proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} en el músculo esquelético.

MAPKAPK5 codifica la proteína quinasa MK5 cuya activación depende de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Según la literatura, MK5 está implicada en procesos neurológicos, de supresión de tumores, angiogénesis y algunas funciones cardíacas. En esta tesis se identificaron mutaciones bialélicas en *MAPKAPK5* como causa de un nuevo síndrome que engloba alteraciones del desarrollo neurológico y cardíaco y anomalías faciales junto con simpolidactilia. Asimismo, en este trabajo, se llevaron a cabo estudios funcionales en fibroblastos primarios de uno de los pacientes con mutaciones en este gen, en los que se demostró ausencia de MK5 y disminución de los niveles de ERK3, una de las proteínas reconocidas como interaccionantes con MK5. Estos estudios también pusieron de manifiesto que la capacidad de recuperación de los filamentos de actina en los fibroblastos primarios con mutaciones en MK5, previamente tratados con el inhibidor de la polimerización de la actina Latrunculina-B, es menor que en células control, lo que está en consonancia con la hipótesis de que MK5 juegue un papel importante en la regulación del esqueleto de actina.



ABSTRACT

To have the right diagnosis for a disease is key for the quality of life of the patient. In the case of rare diseases, to achieve this diagnosis can become an odyssey of several years, and even decades, which results in the delay of having a potential effective treatment, the mostadequate care, or affect family life planning. The objective of this thesis was to determine the implication of genetic variants identified by whole exome sequencing in *FXR1* and *MAPKAPK5* as the cause of two rare congenital diseases with paediatric manifestation, through the analysis of experimental models to clarify the molecular pathology associated with these variants.

FXR1 encodes an RNA binding protein. This gene gives rise to 7 different isoforms of mRNA by alternative splicing, some of them being tissue specific. In skeletal and cardiac muscle there are only two isoforms, e and f, which are characterized by the incorporation of an exon 15, exclusive to these tissues. *FXR1* had previously been associated with muscle defects in model organisms by gene silencing, and with neonatal lethality, due to cardiac and/or respiratory failure, in constitutive knockout mice for all *Fxr1* isoforms. In this thesis, we have studied the natural history of the disease resulting from recessive mutations that exclusively affect the muscle-specific isoforms of *FXR1* by means of: i) the analysis of two mouse lines with mutations in the exon 15 of *Fxr1* generated by CRISPR-Cas9 technology, which showed non-lethal myopathies that vary in severity depending on the effect of each mutation in the protein, and ii) the analysis of the expression and localization of the proteins encoded by *FXR1* in myoblast cultures from a patient with mutations in the muscle isoforms of this gene. These studies have shown that certain *FXR1* mutations result in smaller e/f muscle isoforms, which accumulate in ring-shaped cytoplasmic granules in myotubes and muscle fibers. These granules are neither stress granules, nor aggresomes, but retain the ability to bind mRNA. The transcriptomic analysis of the skeletal muscle of mice with mutations in exon 15 of *Fxr1*, demonstrated alterations in several signalling pathways, such as the pathway of p53 family of proteins, in genes involved in inflammation and apoptosis, as well as in transcripts corresponding to proteins involved in Ca^{2+} homeostasis in skeletal muscle.

MAPKAPK5 encodes the MK5 protein kinase whose activation depends on mitogen-activated protein kinases (MAPKs). According to the literature, MK5 is involved in neurological processes, tumor suppression, angiogenesis, and some cardiac functions. In this thesis, biallelic mutations in *MAPKAPK5* were identified as the cause of a new syndrome that encompasses neurodevelopmental, cardiac and facial anomalies combined with synpolydactyly. In addition, in this work, functional studies conducted in primary fibroblasts from a patient with mutations in this gene, demonstrated absence of MK5 and decreased levels of ERK3, one of the proteins recognized as a MK5 binding partner. These studies also showed that the recovery of actin filaments in primary fibroblasts with mutations in MK5 previously treated with the actin-depolymerising agent Latrunculin-B, is less efficient than in control cells, which is in line with the hypothesis that MK5 plays an important role in the regulation of the actin skeleton.



ÍNDICE

Contenido

CLAVE DE ABREVIATURAS	33
INTRODUCCIÓN	43
Enfermedades Raras y su diagnóstico	45
Músculo esquelético	45
Estructura	46
Miogénesis	51
Miopatías congénitas: Tipos y Etiología.	52
Familia génica del X-frágil	54
Splicing alternativo en <i>FXR1</i> y su expresión diferencial	56
Función de FXR1P en el músculo esquelético	57
Vía de señalización MAPK quinasa	58
MAPKAPK5	60
Estructura	60
Regulación de la localización subcelular y activación	62
Sustratos y Función biológica de MK5	63
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
Muestras humanas	73
Análisis genético	73
Secuenciación Sanger	73
Cultivos celulares	74
Inmunoblot	75
Ratones transgénicos	76
Pruebas de rendimiento funcional	76
Resonancia magnética (MRI)	78

Absociometría de rayos X de energía dual (DEXA) y rayos X	79
Histopatología	79
Microscopía electrónica de transmisión de tejido de ratón y miotubos diferenciados	80
Inmunomarcaje post embedding con partículas de oro (Inmunogold)	80
Aislamiento de fibras musculares a partir del músculo EDL e inmunofluorescencia	80
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARN	81
Mutagénesis dirigida, plásmidos y transfecciones	82
Inducción de gránulos de estrés y agresomas	82
Cuantificación de fluorescencia en agresomas	83
Análisis de transcriptoma mediante RNAseq	83
PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	84
Ensayo de remodelación del citoesqueleto de filamentos de actina (F-actina)	85
Cuantificación por citofluorescencia de la proporción F-actina/G-actina	85
Imagen, análisis estadísticos y bases de datos	86
RESULTADOS	89
Capítulo 1: Caracterización de un nuevo tipo de miopatía congénita causada por mutaciones en el gen <i>FXR1</i>	91
Evaluación clínica	91
Identificación de mutaciones recesivas en el exón 15 exclusivo de músculo de <i>FXR1</i> en pacientes con miopatía congénita	92
Las isoformas musculares de FXR1P con la mutación delACAG tienen diferente solubilidad y se localizan en gránulos citoplasmáticos	96
Los mioblastos delACAG tienen reducida la capacidad de formar miotubos	98
Ratones con diferentes mutaciones del exón 15 de <i>Fxr1</i> muestran fenotipos miopáticos variables	100
La densidad mineral ósea está disminuida en ratones delACAG	103
Miopatía multi-minicore en ratones portadores de mutaciones en el exón 15 de <i>FXR1</i>	106
Correlación entre el fenotipo miopático de las líneas murinas con mutación en el exón 15 de <i>Fxr1</i> , con la expresión y localización subcelular de las iso-e/f de FXR1P	112

Los gránulos delACAG contienen ARNm-poliA	121
Los gránulos delACAG no son gránulos de estrés, ni forman parte de agresomas	123
Las isoformas e/f mutantes se ensamblan en gránulos tipo anillo en células HeLa	126
Perfil de expresión del músculo esquelético en ratones CRISPR delACAG	130
Capítulo 2: Mutaciones bialélicas en <i>MAPKAPK5</i> causan una alteración del desarrollo caracterizada por anomalías neurológicas, cardíacas y faciales junto con simpolidactilia.....	135
Evaluación clínica y estudios genéticos iniciales.....	135
Variantes de bialélicas de pérdida de función en <i>MAPKAPK5</i> causan múltiples anomalías congénitas	138
La ausencia de isoformas de MK5 origina niveles reducidos de ERK3	139
Fibroblastos con mutaciones en <i>MAPKAPK5</i> presentan alteraciones en el proceso de remodelación de la actina	141
DISCUSIÓN	145
Capítulo 1: Caracterización de un nuevo tipo de miopatía congénita causada por mutaciones en el gen <i>FXR1</i>	147
Capítulo 2: Mutaciones bialélicas en <i>MAPKAPK5</i> causan una alteración del desarrollo caracterizada por anomalías neurológicas, cardíacas y faciales junto con simpolidactilia.....	153
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161
ANEXO I TABLAS	187
ANEXO II ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	197



CLAVE DE ABREVIATURAS

aCGH: Array de hibridación genómica comparativa (*Array based comparative genomic hybridization*)

ACTA1: α -actina 1

ACTN2: α -actinina 2

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANKRD1: Anquirina (*Ankyrin repeat domain 1*)

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN transferencia

ARS: Arsenito

AS: Síndrome de Angelman

ATP: Adenosina tri-fosfato

BAER: Respuesta auditiva del tronco encefálico (*Brain auditory evoked response*)

BAF: Frecuencia alelo-B (*B Allele frequency*)

Bex1: Proteína ligada al X expresada en cerebro 1 (*Brain Expressed X-Linked 1*)

BCA: Ácido bicinconínico (*Bicinchoninic acid*)

BIN1: Anfifisina 2 (*Bridging integrador-1*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)

CAP: Persistencia del conducto arterioso

CACNA1S: Subunidad alfa 1S del canal del canal dependiente de voltaje (*Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 S*)

Cas9: Proteína asociada a CRISPR 9 (*CRISPR asociated protein 9*)

CCDC78: *Coiled-coil domain-containing protein 78*

CDC14A: Proteína fosfatasa de especificidad dual CDC14A (*Dual specificity protein phosphatase CDC14A*)

CDK1NA: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*)

CFL2: Cofilina específica de músculo

CIA: Comunicación interauricular

c-MYC: factor de transcripción proto-oncogen MYC

COX-IV: Complejo IV de la citocromo c oxidasa

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Ct: Carboxilo terminal

Cxcl10: Quimocina 10 con motivo C-X-C (*C-X-C motif chemokine ligand 10*)

DEG: Genes expresados diferencialmente (*Differentially expressed genes*)

DEXA: Absorciometría de rayos X de energía dual

DG/VCF: Síndrome de DiGeorge y Velocardiofacial

DM1: Distrofia miotónica tipo I

DMBA: Dimetilbenzantraceno

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMO: Densidad mineral ósea.

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNM2: Dinamina 2

E6AP: Proteína ubiquitina ligasa asociada a E6 (*Ubiquitin ligase E6 associated protein*)

ECG: Electrocardiograma

Eda2r: Receptor A2 de la ectodisplasina (*Ectodysplasin A2 receptor*)

EDL: Extensor largo de los dedos (*Extensor Digitorum Longus*)

EEG: Electroencefalograma

ER: Enfermedad rara

ERK: Proteína quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular signal regulated kinase*)

FAK: Proteína quinasa de adhesión focal (*Focal adhesion kinase*)

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

FI: Incremento (*Fold increase*)

FISH: Hibridación in situ fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization*)

FMR1: Gen de retraso mental X frágil (*Fragile X mental retardation 1*)

FRG1: Gen 1 de la región de la distrofia muscular facioescapulohumeral (*FSHD Region Gene 1*)

FSDH: Distrofia muscular fascioescapulohumeral

FXR1: Gen relacionado con X frágil 1 (*Fragile X related 1*)

FXR2: Gen relacionado con X frágil 2 (*Fragile X related 2*)

Gdf15: Factor de crecimiento/diferenciación 15 (*Growth differentiation factor 15*)

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)

GO: Ontología génica (*Gene ontology*)

Gusb: β -glucuronidasa

HACD1: 3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

H-E: Hematoxilina-eosina

HIV-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

hnRNP: Ribonucleoproteína nuclear heterogénea

HNSC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

H-RAS: Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*)

HS: Suero de caballo (*Horse serum*)

HSP27: Proteína de choque térmico 27 (*Heat shock protein 27*)

hTid-1: Proteína homóloga a *Drosophila* supresora de tumores

IDD: Dominio de desorden intrínseco (*Intrinsically disordered domain*)

IF: Fracción insoluble (*Insoluble fraction*)

IGF2BP: Proteína de unión al ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (*Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins*)

IIBM: Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid

INGEMM: Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz.

JNK: Proteína quinasa c-Jun N-terminal (*Jun N-terminal kinase*)

KBTD13: Ubiquitina ligasa músculo específica

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*)

KH: Homología de dominio K

KLHL40: Miembro de la familia tipo Kelch 40 (*Kelch-like family member 40*)

KLHL41: Miembro de la familia tipo Kelch 41 (*Kelch-like family member 41*)

KO: Knockout

LatB: Latrunculina B

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LLPS: Separación de fase líquido-líquido (*Liquid-liquid phase separation*)

LMOD3: Leiomodina 3

MAF: Frecuencia del alelo menos común (*Minor allele frequency*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*)

MAPKAPK: Proteína quinasa activada por MAP quinasa (*MAPK Activated Protein Kinase 5*)

MAPKK: Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase kinase*)

MAPKKK: Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)

MEGF10: Múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico 10 (*Multiple Epidermal Growth Factor-like domains 10*)

MFD: Diámetro mínimo de Feret (*Minimal Feret's diameter*)

MHC: Cadena pesada de la miosina (*Myosin heavy chain*)

MK5: nombre corto de MAPKAPK5

MK5-Δex6: ratón knockout para MK5 con delección en el exón 6

MK5-Δex8: ratón knockout para MK5 con delección en el exón 8

MLPA: Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MNK: Proteína quinasa de interacción con MAPK (*MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase*)

MRI: Imagen por resonancia magnética (*Magnetic resonance imaging*)

mRNA: ARN mensajero

MSK: Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés (*Mitogen and stress activated protein kinase*)

Mstn: Miostatina

MTM1: Miotubularina

MTMR1: Proteína relacionada con la miotubularina 1

mTORC1: Diana del complejo de rapamicina 1 en mamíferos (*Mammalian target of rapamycin complex 1*)

Myf5: Factor miogénico 5

MYF6: Factor miogénico 6

MYH7: Miosina β -cardíaca esquelética lenta (*Slow skeletal β -cardiac myosin*)

Myh3: Cadena pesada de la miosina 3 (*Myosin heavy chain 3*)

MYL2: Cadena ligera de la miosina 2

MYPD: Miopaladina

NADH-TR: Nicotinamida adenina dinucleótido reducida-tetrazolio reductasa

NEB: Nebulina

NES: Señal de exportación nucleocitoplasmática

Nfkb2: Subunidad 2 del factor nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B subunit 2*)

NLK: Proteína quinasa Nemo-like (*Nemo-like kinase*)

NLS: Secuencia de localización nuclear

NMD: Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (*Non-sense mediated mRNA decay*)

Nos1: Óxido nítrico sintasa 1

NoS: Señal de direccionamiento nucleolar

NSCLC: Cáncer pulmonar de células no pequeñas

Nt: Amino terminal

NTD: Dominio de unión Nt

O/N: Toda la noche (*over night*)

OCT: Temperatura de corte óptima (*Optimal Cutting Temperature*)

OFC: perímetro cefálico occipitofrontal

P82-84: isoformas e y f musculares de FXR1 de 82 y 84 kDa de peso molecular

P/S: Penicilina/estreptomicina (*Penicilli/streptomycin*)

PAK: Proteína quinasa activada por p21 (*p21-activated kinases*)

PBS: Buffer salino fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

PEV: Potenciales evocados visuales

PFA: Paraformaldehído

PKA: Proteína quinasa A

PRAK: Proteína quinasa regulada y activada por p38 (*p38-regulated/activated protein kinase*)

PTC: Codón de terminación prematuro (*Premature termination codon*)

Rb1: Retinoblastoma 1

RGB: Rojo-verde-azul (*Red-Green-Blue*)

RGG: Región Arginina-Glicina-Glicina

RHEB: Proteína homóloga de RAS enriquecida en cerebro (*RAS homolog enriched in brain*)

RNA-seq: Secuenciación del transcriptoma entero por clonación al azar

ROH: Regiones grandes de homocigosidad (*Runs of homozygosity*)

ROI: Región de interés (*Region of interest*)

RSK: Proteína quinasa S6 ribosomal (*Ribosomal S6 kinase*)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (*Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

RYR1: Receptor 1 de rianodina (*Ryanodine receptor 1*)

RYR3: Receptor 3 de rianodina (*Ryanodine receptor 3*)

SCN4A: Subunidad α del canal de sodio (*Sodium voltage-gated channel alpha subunit 4*)

SD: Desviación estándar (*Standar Desviation*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SECISBP2: Proteína 2 de unión a la secuencia de inserción de selenocisteína (*Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2*)

SEM: Error estándar de la media (*Standard error of the mean*)

SEPN1: Selenoproteína N (*Selenoprotein N*)

SEPT: Septina (*Septin*)

SF: Fracción soluble (*Soluble fraction*)

SG: Gránulos de estrés (*Stress granules*)

siRNA: ARN pequeño de interferencia (*small interfering RNA*)

SLN: Sarcolipina (*Sarcolipin*)

SMN1/2: Supervivencia de la neurona motora 1/2 (*Survival of motor neuron 1/2*)

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (*Single nucleotide polymorphism*)

SPEG: Proteína quinasa expresada preferencialmente en músculo estriado (*Striated muscle preferentially expressed protein kinase*)

SPG11: paraplejia espástica familiar tipo 11 (*Spastic paraplegia type 11*)

SR: Retículo sarcoplásmico (*Sarcoplasmic reticulum*)

Tbp: Proteína de unión a caja TATA (*TATA-Box binding protein*)

TC: Tomografía computarizada

TEM: Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*)

Terc: Componente de ARN de la telomerasa (*Telomerase RNA component*)

TF: Tetralogía de Fallot

TH: Tirosina hidroxilasa (*Tyrosine hydroxylase*)

TIAR: Proteína relacionada con TIA1 (*TIA1 related protein*)

Tnfrsf22: Miembro 22 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22*)

Tnfrsf23: Miembro 23 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22*)

TNNT1: Troponina T lenta (*Slow skeletal muscle troponin T*)

TNNT3: Troponina T 3 rápida (*Fast skeletal muscle troponin T*)

TPM2: β -tropomiosina (*beta-tropomyosin*)

TPM3: α -tropomiosina lenta (*Slow alpha-tropomyosin*)

Trp53: Antígeno tumoral celular p53 (*Cellular tumoral antigen p53*)

Trp63: Proteína tumoral p63 (*Tumoral protein p63*)

Trp73: Proteína tumoral p73 (*Tumoral protein p73*)

TTN: Titin

TUB: Tubulina

UTR: Regiones no traducidas de los genes (*Untranslated region*)

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

WB: *Western Blot*

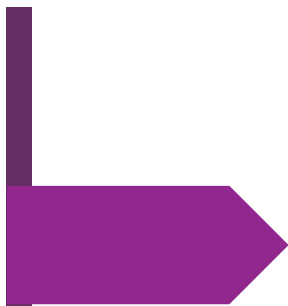
Wdr35: Dominio de repetición WD 35 (*WD repeat domain 35*)

WES: Secuenciación masiva de exoma (*Whole exome sequencing*)

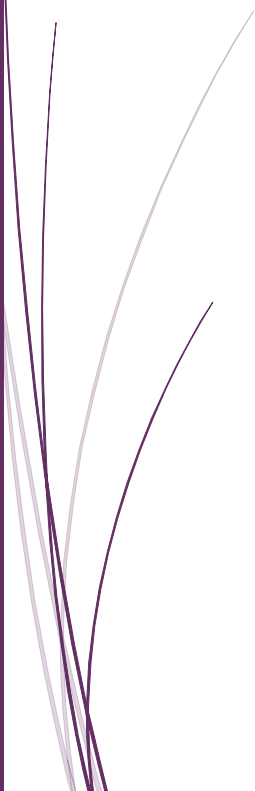
WT: Alelo normal (*Wild type*)

YAP: Regulador transcripcional asociado Yes1 (*Yes1 associated transcriptional regulator*)

ZAK: Motivo alfa estéril y cremallera de leucina que contiene quinasa (*Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase*)



INTRODUCCIÓN



Enfermedades Raras y su diagnóstico

Una enfermedad rara (ER) es aquella que afecta a un reducido número de personas. A nivel de la Unión Europea, se define como ER aquella enfermedad que no afecta a más de 5 personas de cada 10.000 (Consejo et al., 2013). Aunque puede parecer que el número de personas afectadas por este tipo de enfermedades es pequeño, dada la gran cantidad de ER descritas hasta ahora, si se consideran en su conjunto, el porcentaje de población afectada por algún tipo de ER es considerable. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el total de ER afectan al 7% de la población mundial, unos 30 millones de personas en Europa (Consejo et al., 2013). Esto implica que el impacto de las ER en la población, y en los sistemas de salud, es importante. Desde el punto de vista clínico, un gran número de ER son crónicas y degenerativas e implican un déficit motor, sensorial y/o intelectual grave, que provoca un elevado grado de dependencia en estos pacientes y, en muchos casos, son potencialmente mortales. Por otra parte, presentan una gran diversidad de síntomas, a veces, incluso puede existir cierta variación entre pacientes de familias no relacionadas que presentan una misma enfermedad, o entre pacientes pertenecientes a una misma familia. Muchas de estas enfermedades no disponen de tratamientos curativos, tan solo paliativos de los síntomas.

La búsqueda de un diagnóstico correcto cuando se trata de un paciente con una ER puede convertirse en lo que se conoce como odisea diagnóstica. Este término se define como el tiempo que transcurre entre los primeros indicios de un trastorno poco común y el momento en que se hace un diagnóstico. La media de duración de este periodo está en torno a cinco años, aunque en el caso de enfermedades no diagnosticadas, este tiempo se puede llegar a duplicarse. Debido a que un alto porcentaje de este tipo de enfermedades son de origen genético (~80%) y que, dentro de estas, muchas siguen un patrón de herencia monógena, el avance en las técnicas de secuenciación masiva de exoma (WES), así como la información proveniente del fenotipo de modelos experimentales modificados genéticamente, ha conseguido reducir el tiempo necesario para la obtención un diagnóstico adecuado para este tipo de enfermedades (Basel & McCarrier, 2017; Thevenon et al., 2016).

La identificación de las bases genéticas y moleculares de las ER es un factor determinante, ya que, además de proveer de consejo genético adecuado a las familias afectadas, permite comprender mejor la patología subyacente a cada enfermedad, y generar información que posteriormente podría ser de utilidad para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Músculo esquelético

El músculo esquelético es una unidad biomecánica formada por un conjunto de componentes interaccionantes entre los que se encuentran: la fibra muscular, los nervios autónomos que transmiten el impulso nervioso, el sistema vascular que le otorga una oxigenación eficiente, así como toda la maquinaria metabólica y de regulación integrada para mantener la homeostasis.

La función principal del músculo esquelético es la producción de energía mecánica a partir de la conversión de compuestos químicos, para generar una fuerza que, además de mantener la postura, permite el movimiento voluntario del cuerpo. Además, desde el punto de vista metabólico, el músculo desarrolla funciones de mantenimiento de la temperatura corporal, mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, así como ser una fuente de almacenamiento de diversos compuestos, como aminoácidos y carbohidratos, utilizados por otros tejidos para la síntesis de proteínas (Frontera & Ochala, 2015; Mukund, 2020).

Estructura

Las células musculares, también denominadas fibras musculares o miofibras, son estructuras cilíndricas multinucleadas, de entre 20 y 100 μm de diámetro y varios centímetros de largo (siendo las más largas de aproximadamente 12 cm), que contienen un elevado número de mitocondrias, necesarias para poder mantener el elevado ritmo metabólico de estas células (Feher, 2017). Miles de fibras musculares se agrupan para formar un haz de fibras, y la asociación de varios haces de grupos de fibras unidos a un tendón en cada extremo forma los músculos. En cada nivel estructural existe una membrana de tejido conectivo que rodea y protege las estructuras musculares, denominadas desde la más externa a la más interna, epimisio, perimisio y endomisio (Fig. 1).

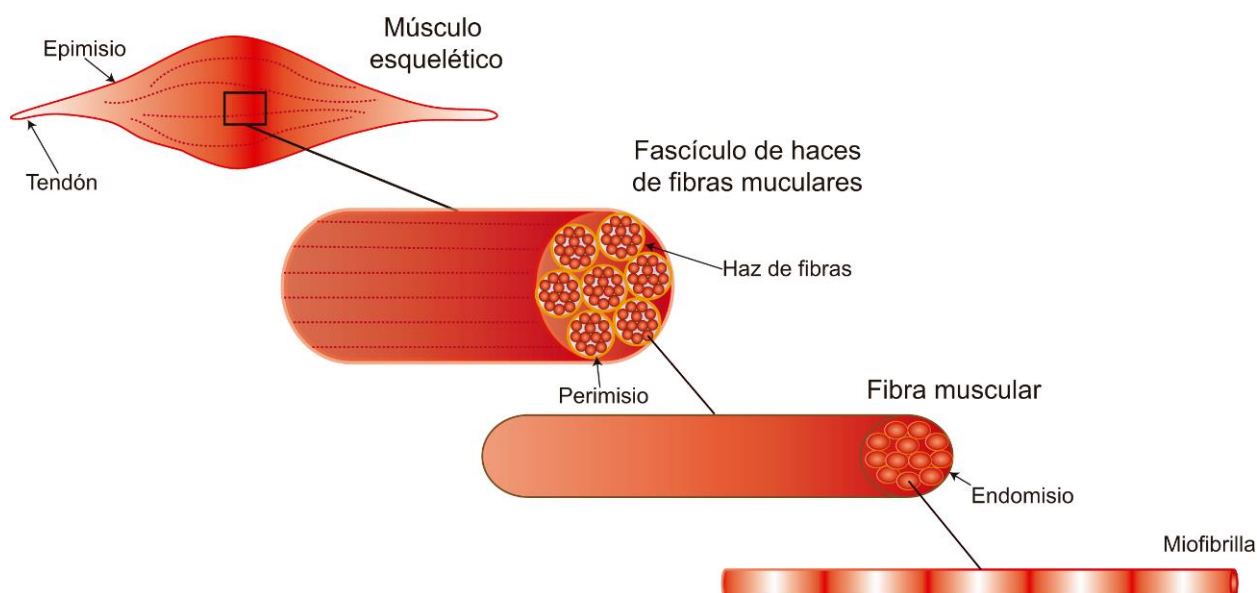


Figura 1. Estructura anatómica del músculo esquelético. Representación esquemática de la estructura anatómica del músculo esquelético ilustrando los diferentes niveles de agrupación: desde el músculo esquelético, formado por agrupaciones de haces de fibras musculares hasta las miofibrillas cuya agrupación da lugar a la célula muscular o miofibras. Cada nivel de agrupación, desde la fibra muscular hasta el músculo, está rodeado por una membrana de tejido conectivo, denominadas episimio, perimisio y endomisio, según su localización.

El tamaño y la composición del tipo de fibra del músculo esquelético son los determinantes de la fuerza que se genera. Existen dos tipos principales de fibras musculares esqueléticas (Mukund, 2020):

- Fibras de contracción lenta o Tipo I: son fibras altamente vascularizadas con elevada concentración de mioglobina y un gran número de mitocondrias, lo que tiene como consecuencia un alto contenido de enzimas oxidativas y mitocondriales. Están presentes en mayor proporción en los músculos responsables de actividades de baja tensión, pero gran continuidad. Presentan resistencia a la fatiga.
- Fibras de contracción rápida o Tipo II: estas fibras tienen una alta capacidad glucolítica, son menos vascularizadas que las fibras de tipo I y generan una elevada fuerza de contracción. Se dividen en tres subtipos en función de la velocidad contráctil y las diferentes isoformas de miosina predominante:
 - Subtipo IIA: predomina la isoforma de miosina MYH2.
 - Subtipo IIB: predomina la isoforma MYH4.
 - Subtipo IIX: predomina la isoforma MYH1.

Cada miofibra está constituida por miofibrillas, y redes de citoesqueleto que anclan estas miofibrillas a la membrana plasmática de la fibra muscular, denominada sarcolema. Las miofibrillas se componen principalmente de filamentos de actina y miosina, repetidos y ordenados específicamente para formar la unidad funcional contráctil, conocida como sarcómero. Cada sarcómero se encuentra delimitado por dos discos Z, formados por un entramado de proteínas a las que se anclan los filamentos de actina (Luther, 2009). La imagen típica de la estructura sarcomérica, observada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), muestra dos bandas claras (bandas I, isótropas) formadas principalmente por filamentos de actina, las cuales están divididas en dos partes por una línea más oscura que corresponde al disco Z. El sarcómero también contiene una banda más ancha, denominada banda A (anisótropa), correspondiente a los filamentos de miosina y actina, la cual está fraccionada en dos por la zona-H, constituida únicamente por filamentos de miosina. En la parte central de la zona-H existe una línea más oscura denominada línea M, que representa el lugar de anclaje de los filamentos de miosina a través de complejos multiproteicos (Fig. 2a) (Hall and Guyton 2011). Además de estos filamentos principales, los sarcómeros incluyen una red altamente organizada de un amplio número de proteínas implicadas en la funcionalidad y mantenimiento de esta estructura. En las figuras 2a y 3 se muestra la estructura sarcomérica y algunas de las principales proteínas involucradas en su formación y mantenimiento.

El sarcolema rodea la fibra muscular y presenta numerosas invaginaciones especializadas denominadas túbulos transversales (túbulos-T), los cuales se ramifican y extienden por toda la miofibrilla situándose sobre el disco Z. En el músculo esquelético, a cada lado de los túbulos T se sitúan dos cisternas del retículo sarcoplásmico (SR) formando lo que se denomina tríada (Fig. 2b). Esta estructura es un elemento importante en la transmisión del impulso nervioso, ya que en ella se localizan distintas proteínas implicadas en la regulación de la movilización de Ca^{2+} y, por tanto, en el acoplamiento de la excitación-contracción muscular

(Berchtold et al., 2000; Kaisto & Metsikko, 2003). Específicamente, en estas invaginaciones, en el músculo esquelético, el receptor de hidropiridina (DHPR), dependiente de voltaje, que se localiza transmembranalmente en el sarcolema, interacciona con el receptor de rianodina (RYR), el cual está anclado a la membrana del SR. Cuando la señal nerviosa se transmite a través de la unión neuromuscular, se produce la despolimerización del sarcolema, la cual provoca un cambio conformacional del DHPR, que resulta en la activación del receptor RYR. El resultado es la liberación de Ca^{2+} de su unión a la proteína calsecuestrina, y su movilización fuera del SR. Una vez en el sarcoplasma, el Ca^{2+} se une al complejo de troponina, localizada sobre los filamentos de actina, activándose la contracción. Posteriormente, otra proteína de la membrana del SR, SERCA, introduce, con gasto de ATP, los iones Ca^{2+} de nuevo al sarcolumen. Otras proteínas, como junctin y triadina (Fourest-lieuvain et al., 2007; Osseni et al., 2016), unidas a RYR, o sarcolipina (SLN), inhibidor de SERCA (Odermatt et al., 1998), participan regulando todo este proceso (Fig. 2c).

Para que el sarcolema permanezca estable durante los ciclos de contracción y relajación es necesario que las miofibrillas se anclen de alguna manera a la membrana. Para ello, unas estructuras formadas por agregados proteicos, localizados periódicamente en el sarcolema, sirven de punto de anclaje de la miofibrilla a la altura del disco Z y la línea M. A estas estructuras se las denomina costámeros y son los intermediarios en unir el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular, además de desempeñar un papel en la conversión de estímulos mecánicos en señales celulares y en cambios en la expresión génica (Jaka et al., 2015). El complejo proteico asociado a distrofina (α - β -dystroglicanos, sarcoglicanos, α -dystrobrevina, sintrofina, nNOS, caveolina-3, sarcospan y laminina), junto con el complejo receptor de la integrina (α_7 -integrina, β_1 -integrina, talina, vinculina y paxilina), ambos situados en el sarcolema, participan en la unión de la lámina basal extracelular con los discos Z, a través de proteínas costaméricas que incluyen desmina, citokeratina, γ -actina, α -actinina y espectrina, entre otras. (Anastasi et al., 2003; Clark et al., 2002; Craig & Pardo, 1983; Jaka et al., 2015) (Fig. 3).

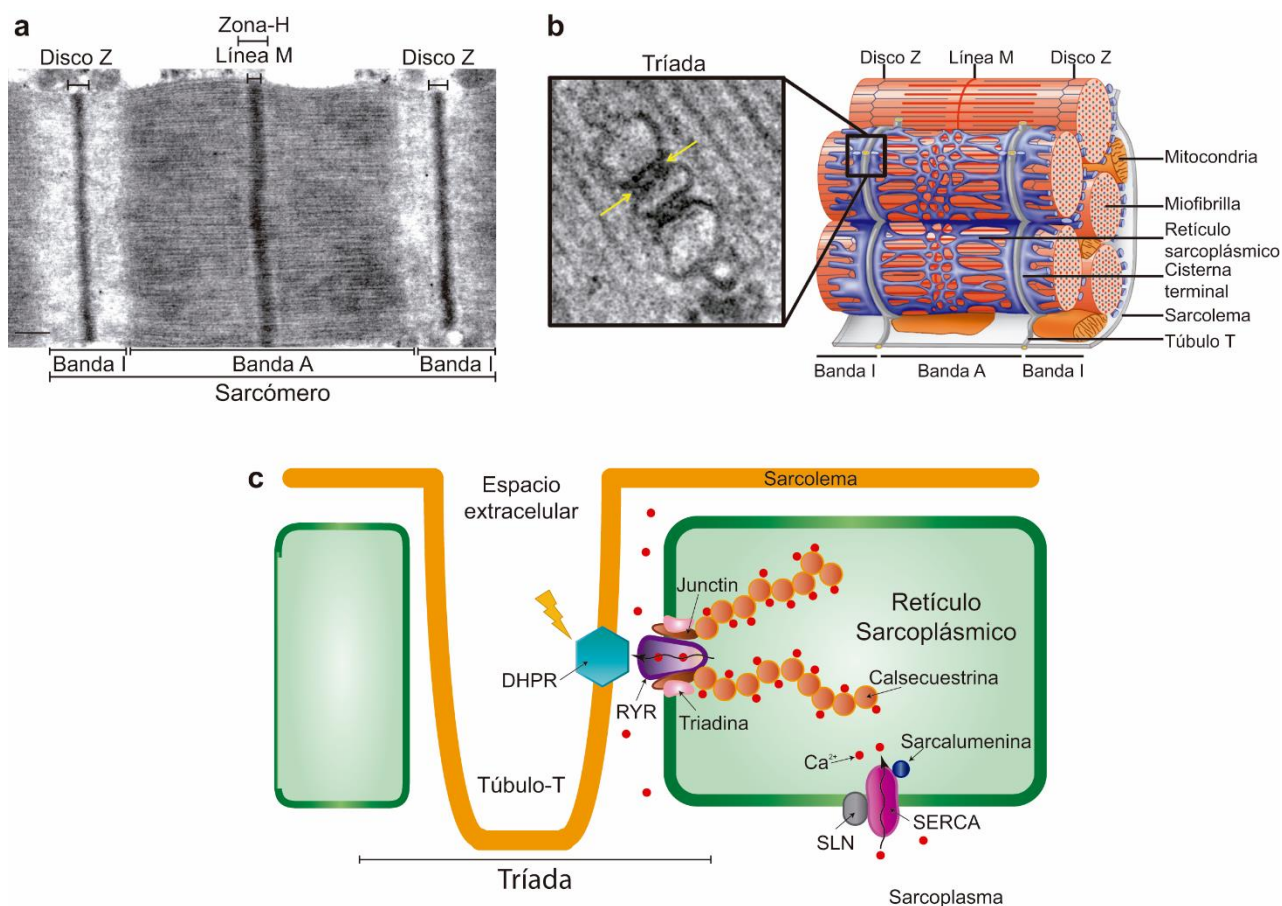


Figura 2. Estructura de la unidad funcional muscular. a) Imagen de una micrografía obtenida por TEM donde se observan las distintas partes de la estructura sarcomérica. Las bandas I (isótropas), formadas principalmente por filamentos de actina, donde se localizan los discos Z, y la banda A (anisótropa), formada por filamentos de actina y miosina, dividida en dos por la zona-H, donde únicamente aparecen filamentos de miosina, y en cuyo centro se encuentra la línea M que es la zona de anclaje de los filamentos de miosina. Barra de escala = 200 nm. b) Organización de la tríada en el músculo esquelético. Izquierda: imagen de una micrografía obtenida por TEM de una tríada. El túbulo-T está flanqueado por una cisterna terminal del retículo sarcoplásmico. Las flechas indican zonas densas correspondientes al complejo receptor rianodina (RYR)-receptor de dihidropiridina (DHPR). Derecha: representación esquemática de un sarcómero y las membranas circundantes. Los túbulos-T se localizan a la altura de los discos Z. A cada lado del túbulo-T se encuentra una cisterna terminal de SR perteneciente a sarcómeros contiguos. Los túbulos-T se muestran en gris. La red elaborada por el retículo sarcoplásmico se muestra en azul. Imagen extraída y modificada de Al-Qusairi and Laporte 2011. c) Representación esquemática de una tríada. En la zona invaginada del sarcolemma (túbulo-T) se localizan receptores DHPR, dependientes de voltaje, que interaccionan con el receptor RYR, anclado en la membrana del SR. Cuando el sarcolemma se despolariza, el DHPR cambia su conformación activando a RYR, liberándose el Ca^{2+} de su unión a calsequestrina, el cual, sale del SR para unirse a la troponina y activar el proceso de contracción. Para que la homeostasis del Ca^{2+} se mantenga, SERCA, una bomba ATPasa que se encuentra en la membrana del SR, introduce de nuevo los iones Ca^{2+} al sarcolumen. Otras proteínas unidas a estos receptores están implicadas en la regulación del proceso de movilización del Ca^{2+} , como son el complejo triadina-junctin, unido a RYR y la sarcoplipina (SLN) que interactúa con SERCA inhibiéndole.

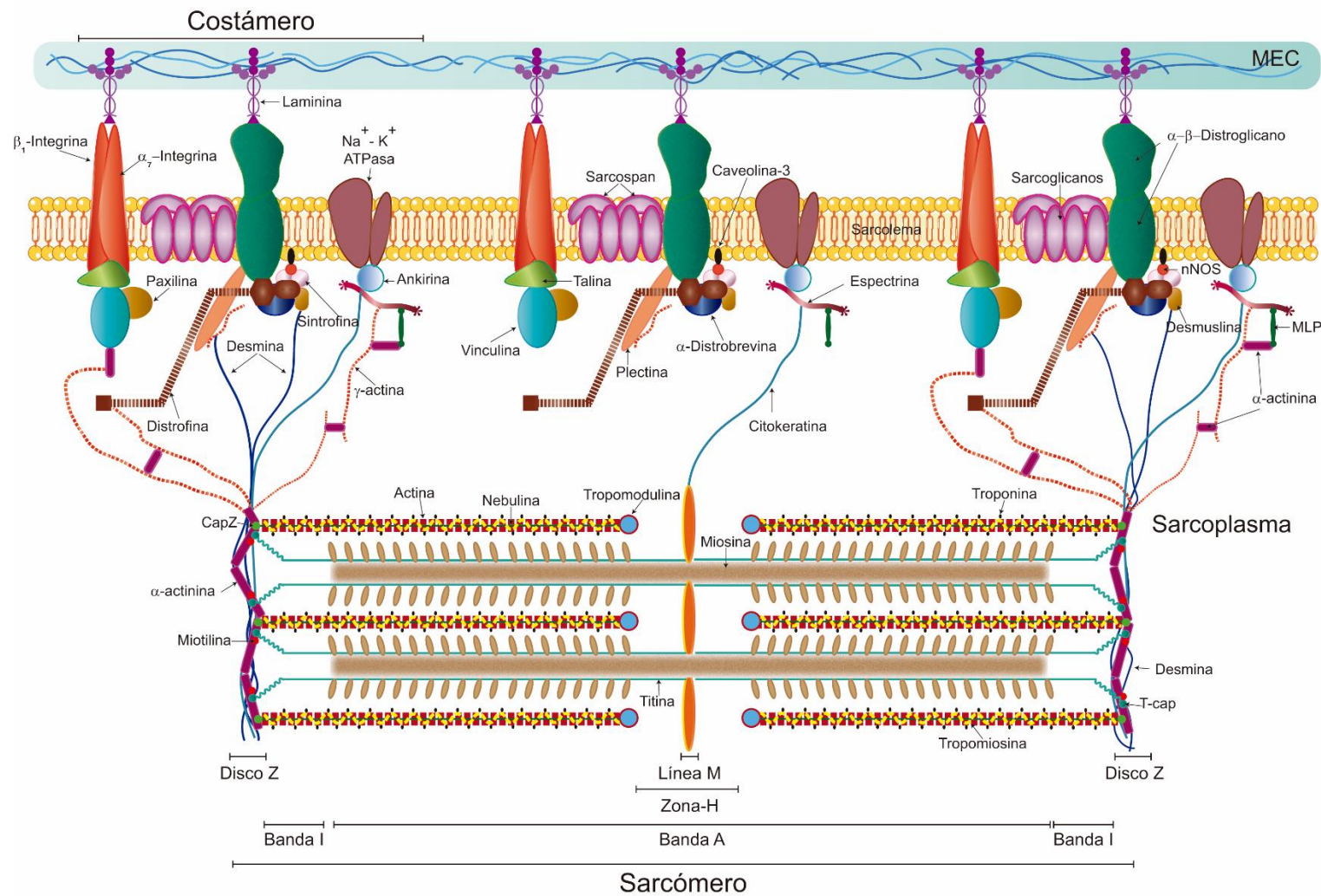


Figura 3. Estructura y componentes del sarcómero y su anclaje a la matriz extracelular a través de los costámeros. Representación esquemática de la estructura sarcomérica y algunos de sus componentes, así como su interacción con la matriz extracelular (MEC) a través de estructuras costaméricas, ancladas al sarcolemma. El complejo de proteínas unidas a las α_7 -integrina y β_1 -integrina y el complejo asociado a distrofina, anclan el sarcómero a la MEC a través del disco-Z y la línea M a través de proteínas como desmina, citokeratina, γ -actina, α -actinina y espectrina, entre otras.

Miogénesis

A grandes rasgos, el desarrollo del músculo esquelético comienza con la determinación de células mesodérmicas en células precursoras miogénicas uninucleadas proliferativas denominadas mioblastos. Estos mioblastos proliferan hasta que, tras detener el ciclo celular, se diferencian a miocitos no proliferativos, que se alinean y fusionan, dando lugar a miotubos con los diferentes núcleos en posición central. Posteriormente, durante la maduración del miotubo en fibra muscular, los núcleos terminan situados en la periferia de la misma (Yokoyama & Asahara, 2011). Algunas células progenitoras, denominadas células satélite, se mantienen quiescentes, posicionadas entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras musculares. Estas células forman una población heterogénea de células madre y células ya comprometidas a linaje muscular, cuya función en el adulto es la del mantenimiento de la homeostasis del músculo, compensando los eventos de proliferación y diferenciación (Schmalbruch & Lewis, 2000; Tajbakhsh, 2009) (Fig. 4).

El proceso de miogénesis está regulado por la inducción o represión de factores de transcripción miogénicos que se encuentran altamente organizados jerárquicamente. *PAX3/7* son los que regulan la determinación temprana del mesodermo, mientras que *MYF5* y *MYOD* son los que comprometen las células al linaje miogénico. La expresión de los genes de diferenciación terminal, miogenina y *MHC*, son necesarios para la fusión de los miocitos que da lugar a los miotubos y, posteriormente, la fibra muscular (Serratrice, 2009) (Fig. 4).

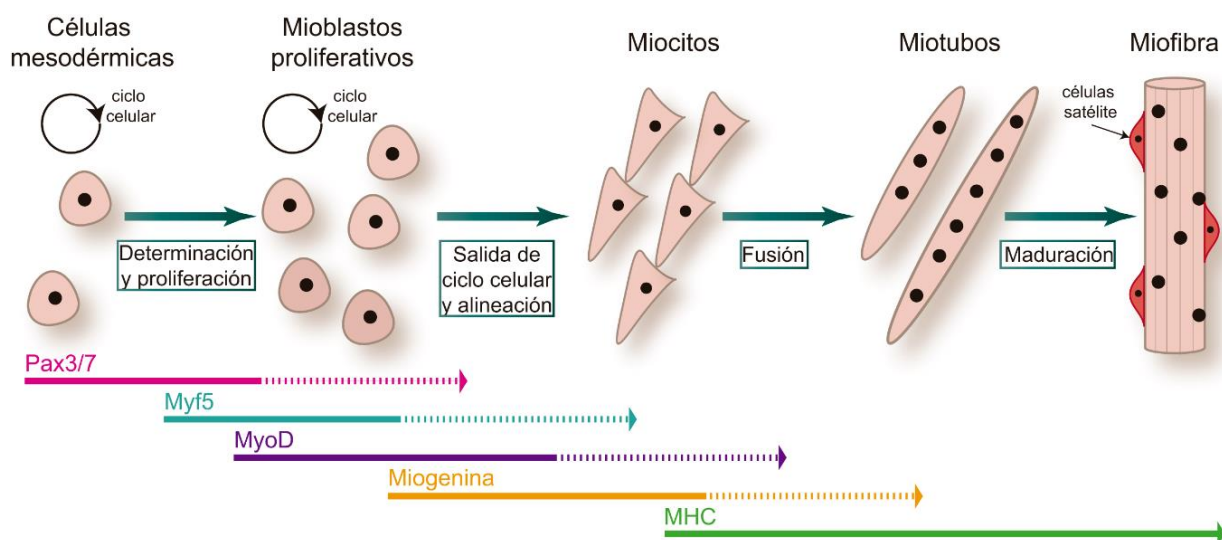


Figura 4. Miogénesis. Representación esquemática del proceso de miogénesis del músculo esquelético durante el desarrollo. Algunos progenitores, denominados células satélite, se mantienen quiescentes, situados entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras musculares, y son las encargadas de la regeneración del músculo esquelético. Este proceso se regula principalmente mediante la inducción o represión de distintos factores de transcripción (*Pax3/7*, *Myf5*, *MyoD*, *Miogenina*, *MHC*) de manera diferencial en las distintas etapas. La flecha se vuelve discontinua cuando el factor de transcripción deja de expresarse.

Miopatías congénitas: Tipos y Etiología.

Las miopatías congénitas son trastornos poco frecuentes (prevalencia media de 1/26.000), genéticamente heterogéneos, que afectan al funcionamiento de las fibras musculares y que suelen manifestarse con hipotonía al nacimiento o en el periodo neonatal, debilidad muscular y retraso en el desarrollo de las habilidades motoras (Claeys, 2020). En la mayoría de los casos, el sistema nervioso central no suele estar implicado, aunque hay excepciones, especialmente en los casos más graves, y los pacientes presentan funciones cognitivas normales (North et al., 2014).

Las miopatías congénitas tradicionalmente se han clasificado en función de las principales características histopatológicas específicas de cada subtipo, detectadas al analizar una biopsia muscular (Claeys, 2020; Clarke & North, 2003; Maggi et al., 2013; North et al., 2014).

- Miopatía con cores: es el subgrupo más frecuente. La principal característica de este tipo de miopatía es la detección de zonas con ausencia de reacción enzimática en la histoenzimología de las biopsias musculares, las cuales se han relacionado con la desaparición de mitocondrias y desorganización miofibrilar. Se pueden clasificar en dos tipos: miopatías “central-core”, cuando estas áreas tienen una extensión significativa a lo largo del eje longitudinal de la miofibra, o miopatía “multi-minicore” cuando las zonas de desorganización de la miofibra son más pequeñas. (Fig. 5a-b).
- Miopatía nemalínica: histológicamente se caracteriza por la acumulación de material derivado del disco Z en forma típica de varilla o bastones. La gravedad se ha asociado en parte a si la localización de estas acumulaciones en forma de bastones se da en el núcleo o en el citoplasma. Se pueden encontrar diferentes variantes: “Core-bastones”, con estructuras “en gorra” (cap) y con cuerpos cebra (Fig. 5c-d).
- Miopatía centronuclear: principalmente caracterizada histopatológicamente por la presencia, en elevada proporción, de núcleos centralizados dentro de las miofibras. También se observan, en mayor o menor medida, fibras en estado de degeneración o regeneración, provocando cambios en los patrones histoenzimáticos normales. (Fig. 5d-e).
- Miopatía por desproporción del tipo de fibra: se caracteriza porque el diámetro medio de las fibras de tipo I es, al menos, un 12% más pequeño que la media del diámetro de las fibras de tipo 2.
- Miopatía de almacenamiento de miosina: comúnmente conocida como miopatía de cuerpos hialinos. Histológicamente se caracteriza por el almacenamiento de regiones granulares no estructuradas (cuerpos hialinos) en la zona inmediatamente inferior al sarcolema.

Actualmente, hay 31 genes diferentes descritos como responsables de los diferentes subtipos de miopatía congénita (Claeys, 2020; Fusto et al., 2019; Jungbluth et al., 2011; North et al., 2014; Schartner et al., 2017). Sin embargo, hay que tener en consideración que la correlación entre gen y subtipo es mucho más compleja.

Así, se han encontrado diferentes genes causantes de un mismo subtipo de miopatía y mutaciones en un mismo gen que pueden resultar en características fisiopatológicas de diferentes subtipos de miopatía congénita (Tabla 1) (Nance et al. 2012; North et al. 2014; Zhou et al. 2007). Incluso se han descrito casos donde la misma mutación puede presentarse con una penetrancia variable en distintos miembros de una misma familia (Zvaritch et al., 2009)

El incremento del número de casos estudiados, tanto a nivel genético como histopatológico, junto con la utilización de modelos animales para el análisis de los mecanismos implicados en estas patologías, han puesto en evidencia que existe una mayor heterogeneidad en este tipo de trastornos, dado que hay una superposición entre las características clínicas, genéticas e histopatológicas.

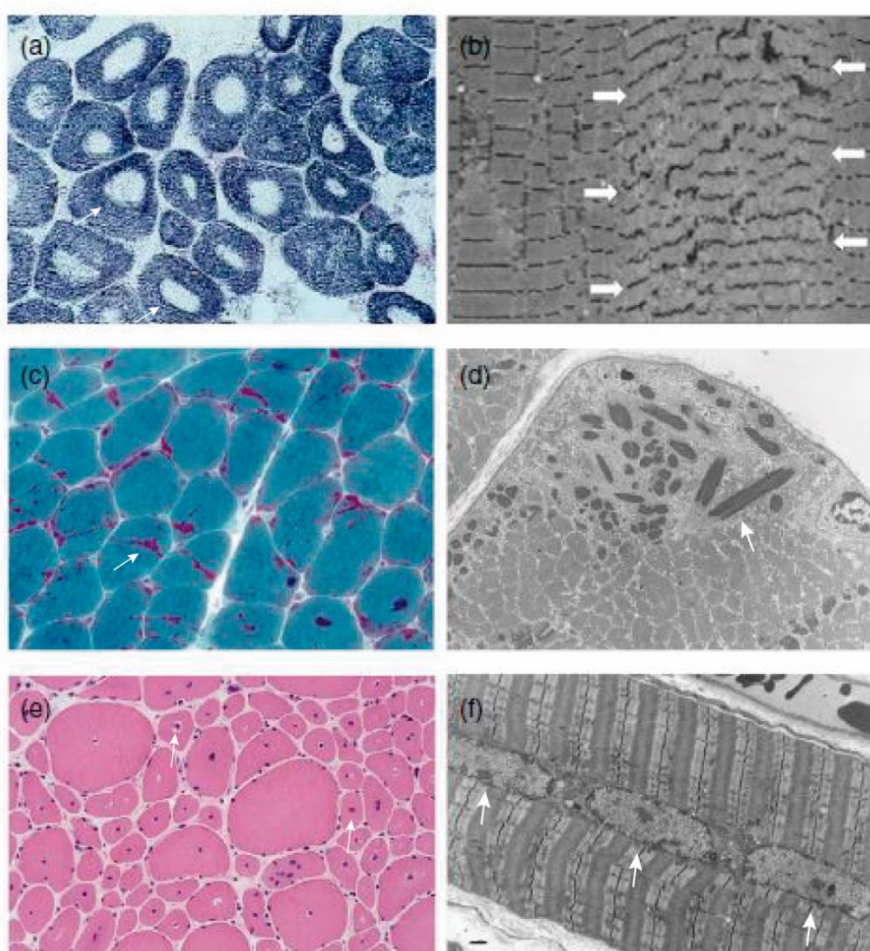


Figura 5. Características histopatológicas de diferentes subtipos de miopatía congénita: a-b) Miopatía congénita con cores. a) Tinción NADH-TR donde se pueden observar grandes cores en el centro de la fibra sin tinción enzimática (flecha). b) Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la que se muestra alteración del patrón miofibrilar que ocupa gran parte de la miofibra (core). c-d) miopatía nemalínica. c) Tinción modificada de Gomori donde se pueden observar los bastones o cuerpos nemalínicos teñidos de rojo (flecha). d) Imagen de TEM de un corte transversal de músculo que muestra la acumulación de bastones (flecha) bajo el sarcolema. e-f) miopatía centronuclear. e) Tinción de hematoxilina eosina (H-E) de un corte transversal de una biopsia muscular que muestra una gran cantidad de núcleos centralizados (flecha). f) Imagen de TEM una sección longitudinal de músculo donde se observan los núcleos en la posición central de la fibra (flecha). Imagen extraída y modificada de Claeys, 2020.

Familia génica del X-frágil

FXR1 (*Fragile X related 1*, 3q26.33), *FXR2* (*Fragile X related 2*, 17p13.1), y *FMR1* (*Fragile X mental retardation 1*, Xq27.3), este último asociado con el síndrome de X frágil, comprenden una familia génica (genes *FXRs*) implicada en la regulación postranscripcional del ARNm (Y. Zhang et al., 1995). Las tres proteínas codificadas por estos genes (*FXR1P*, *FXR2P* y *FMR1P*, respectivamente) son altamente homólogas, presentando varios dominios completamente idénticos. No obstante, también poseen características propias, indicativas de que también pueden realizar funciones específicas y diferenciadas. Las tres proteínas se forman a partir de 17 exones codificantes e incluyen: un dominio de unión amino terminal (NTD) con dos dominios Agenet, con capacidad de reconocer péptidos de histonas trimetiladas (Adams-Cioaba et al., 2010); una secuencia de localización nuclear (NLS); dos dominios KH de homología hnRNP (Mazroui et al., 2003); una secuencia de exportación nuclear (NES), imprescindible para el tránsito núcleo-citoplasmático de estas proteínas (Tamanini, Bontekoe, et al., 1999); y una región de Arginina-Glicina-Glicina (RGG) de unión a ARNm (Siomi et al., 1996) (Fig. 6a). Aunque las proteínas *FXR1P*, *FXR2P* y *FMR1P* poseen una elevada homología en sus regiones amino terminal (Nt) (Kirkpatrick et al., 2001), las regiones carboxilo terminal (Ct) son divergentes entre *FMR1P* y sus homólogos *FXR1P* y *FXR2P*. En particular, la región Ct de *FXR2P* contiene dos señales específicas de localización nucleolar (NoS1 y NoS2), homólogas a las encontradas en la proteína Rev del virus tipo I de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), las cuales están ausentes en *FMR1P*. La secuencia NoS1 se encuentra en todas las isoformas descritas de *FXR1P* y, tanto NoS1 como NoS2, están presentes en las isoformas proteicas que contienen el exón alternativo 15 de *FXR1P* (Tamanini, 2000) (Fig. 6a-c).

Está descrito que *FMR1P* y sus dos proteínas homólogas tienen una localización principalmente citoplasmática. Sin embargo, cuando se inactivó la secuencia NES, se observó una localización nuclear de *FMR1P* y de todas las isoformas de *FXR1P*, salvo las que contienen el exón alternativo 15 que, al igual que *FXR2P* presentaron una localización nucleolar. Esto indica, que la secuencia NoS2 es la principal responsable de la localización nucleolar, pudiendo proveer de una función específica a las proteínas *FXRs* que la presentan (Tamanini, 2000; Tamanini, Bontekoe, et al., 1999). Experimentalmente, se ha determinado que todas las proteínas *FXRs* pueden interaccionar entre sí, aunque preferencialmente forman homo-multímeros, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que es otro indicativo de que, aunque todas pueden formar parte de complejos ribonucleoproteicos, posiblemente sus funciones sean diferentes (Tamanini, Van Unen, et al., 1999).

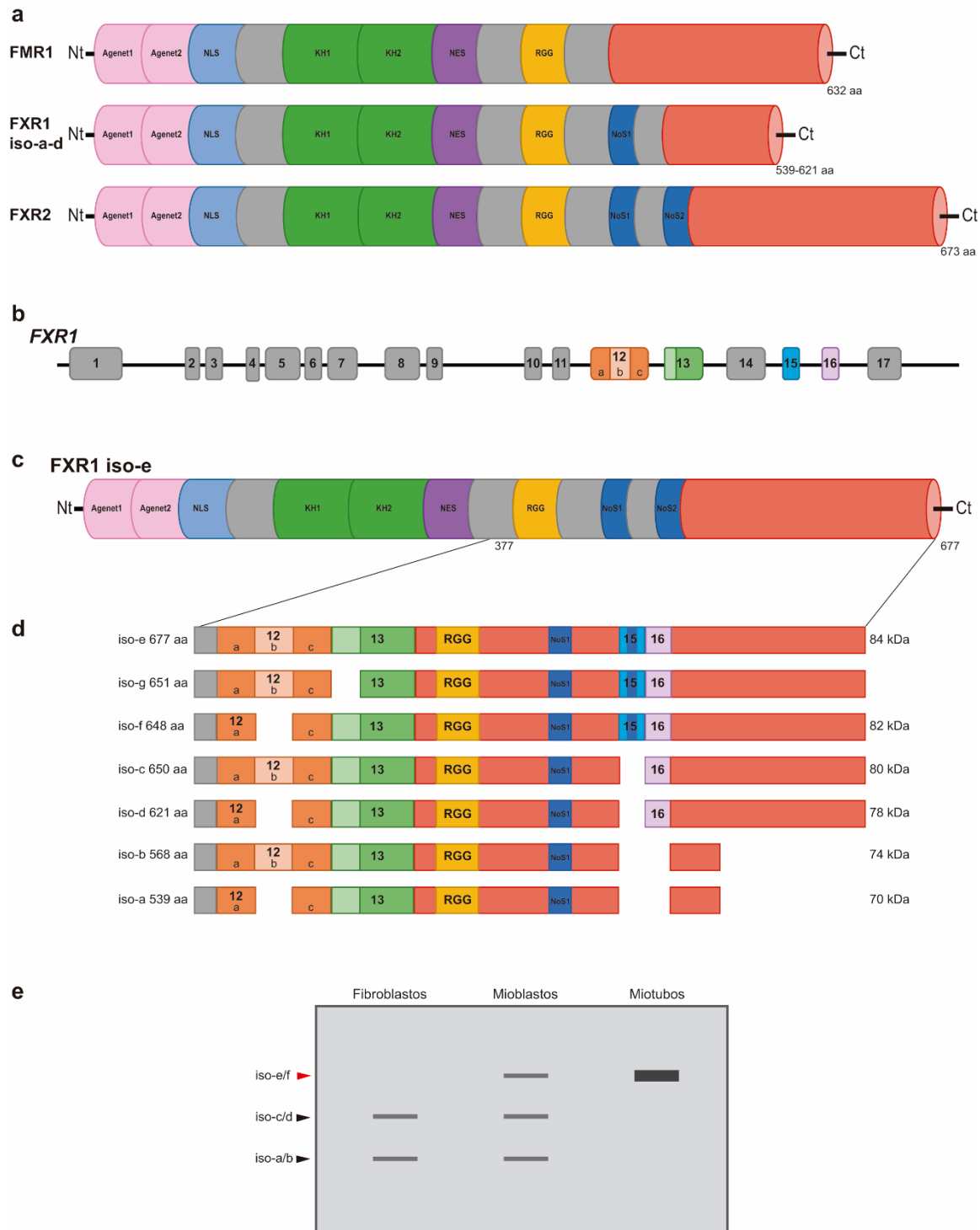


Figura 6. Estructura y splicing alternativo de *FXR1*. a) Representación esquemática de los distintos dominios funcionales de la familia de proteínas, FMR1P, FXR1P y FXR2P. Las tres proteínas presentan: un dominio de unión a Nt, que contiene dos regiones Agetet, la secuencia de localización nuclear (NLS), dos dominios KH, una secuencia de exportación nuclear (NES) y una región Arg-Gly-Gly (RGG). Tanto FXR2P como FXR1P, pero no FMR1P, poseen una señal de localización nucleolar (NoS1). Aunque las tres proteínas tienen un tamaño similar, la longitud del dominio Ct es diferente en cada una de ellas. b) Representación esquemática del gen *FXR1*. Los exones sujetos a splicing alternativo se representan por cajas de diferentes colores, y el resto en gris. El tono más claro de la región central del exón 12, indica que esa es la región sometida a splicing alternativo. De la misma manera se representa la zona procesada de manera alternativa del extremo 5' del exón 13. c) Representación esquemática de la iso-e de FXR1P y sus

correspondientes dominios proteicos indicados en a), y la segunda señal de localización nucleolar (NoS2), la cual aparece únicamente en las isoformas que contienen el exón 15 alternativo (iso-e/f/g). d) Representación esquemática de las 7 isoformas de FXR1P a partir del aminoácido 377. El número de aminoácidos totales y el peso molecular de cada isoforma están indicados, excepto en el caso de la iso-g que únicamente ha sido descrita a nivel de ARNm (Kirkpatrick et al., 1999; Meintjes et al., 2004). Se muestran los exones que se incluyen o excluyen en las distintas isoformas. e) Representación esquemática del patrón de expresión de las distintas isoformas de FXR1P en Western Blot (WB) de extractos proteicos de fibroblastos, mioblastos y miotubos. Las iso-e/f se expresan únicamente en células musculares, siendo mucho mayor su expresión en miotubos diferenciados. Dentro del linaje miogénico las isoformas iso-a-d, que no incluyen el exón 15, se expresan únicamente en las células que aún mantienen la capacidad proliferativa (mioblastos).

Splicing alternativo en *FXR1* y su expresión diferencial

Tanto *FMRI* como *FXR1* son genes en los que se ha observado la existencia de splicing alternativo. Se han descrito hasta 11 isoformas de ARNm diferentes de *FMRI* en humanos (J. Zhang et al., 2019) y 7 de *FXR1* en humanos y ratón (Khandjian, 1998; Kirkpatrick et al., 1999). La diferencia entre estos dos genes es que, mientras que el splicing alternativo de *FMRI* no parece ser específico de tejido, (Verkerk et al., 1993), varias de las isoformas de *FXR1*, se expresan de forma única y diferencial en determinados tejidos (Dubé et al. 2000; Huot 2001; Khandjian 1998; Kirkpatrick et al. 1999).

Las siete isoformas de *FXR1* descritas en humanos y ratón difieren en la presencia o ausencia de cuatro regiones diferentes de ADN, localizadas a partir del exón 12. Comenzando desde el extremo Nt, la primera región sujeta a splicing alternativo es una secuencia de 87 pb situada en el centro del exón 12, y que codifica 29 aminoácidos cuya exclusión no altera el marco de lectura original. Asimismo, la primera parte del exón 13, correspondiente a un segmento de 78 pb que codifica 26 aminoácidos, se ha encontrado ausente en una isoforma (iso-g), cuyo ARNm se ha localizado exclusivamente en corazón (Kirkpatrick et al., 1999). La tercera región con splicing alternativo corresponde a una secuencia de 81 pb, cuya inclusión supone la inserción en fase de 27 aminoácidos y que corresponde con el exón 15. Este exón está presente únicamente en 3 de las 7 isoformas (iso-e, f y g) y codifica la secuencia NoS2 de *FXR1* (Tamanini, 2000). La cuarta y última región con splicing alternativo corresponde con una región de 92 pb que codifica para 30 aminoácidos, y que genera un desplazamiento del marco de lectura dando lugar a un extremo Ct más largo. Este inserto corresponde al exón 16. En las isoformas donde no se ha encontrado este exón presente (iso-a, iso-b), se genera un Ct de tan solo 5 aminoácidos a partir de la base 1693 (Fig. 6b-d). De las 7 isoformas de *FXR1*, cuatro de ellas, también denominadas isoformas cortas (iso-a e iso-b de 70 y 74 kDa, respectivamente) e isoformas largas (iso-c e iso-d de 78 y 80 kDa), se expresan ampliamente en prácticamente todos los tejidos. Las dos isoformas restantes, conocidas por isoformas superlargas (iso-e e iso-f de 84 y 82 kDa, respectivamente) se localizan exclusivamente en el músculo esquelético y cardíaco (Dubé et al., 2000; M.-E. Huot, 2001; Khandjian, 1998; Kirkpatrick et al., 1999). Una excepción es el tejido testicular, donde se han observado altos niveles de todas las isoformas de FXR1P (M.-E. Huot, 2001). Es importante resaltar, que no solo los dominios funcionales de FXR1P, sino también el patrón de expresión de las distintas isoformas de *FXR1*, están conservados a lo largo de la escala evolutiva. Tanto en *Danio rerio* (Engels et al., 2004), como

en *Xenopus* (Marc-Etienne Huot et al., 2005) o ratón (Dubé et al., 2000; Khandjian, 1998; Kirkpatrick et al., 1999), se ha demostrado la existencia de isoformas de FXR1P de mayor peso molecular, que contienen un exón 15 alternativo, y que se expresan diferencialmente en músculo. Sin duda, el elevado grado de conservación en la escala evolutiva del splicing específico de tejido del exón 15, pone de manifiesto la importancia de estas variantes en el desarrollo y función del músculo.

Función de FXR1P en el músculo esquelético

Diversos estudios han analizado la expresión de las variantes de FXR1P durante la miogénesis (Dubé et al., 2000; Engels et al., 2004; Marc-Etienne Huot et al., 2005; Khandjian, 1998; Kirkpatrick et al., 1999). Estos estudios han permitido concluir que los mioblastos en proliferación expresan todas las isoformas de FXR1P. Sin embargo, según avanza la diferenciación de estas células a miotubos, se produce el reemplazo de las isoformas de menor peso molecular por las variantes superlargas portadoras del exón 15 alternativo, las cuales son las únicas que se expresan en las fibras musculares diferenciadas (Fig. 6d). Mediante técnicas inmunológicas, Dubé et al., 2000, determinaron que, en la etapa de mioblasto inmaduro las isoformas superlargas iso-e/f se localizaban principalmente en el núcleo, cambiando el marcaje de estas isoformas a citoplasmático en los miotubos diferenciados. En músculo adulto, las isoformas de FXR1P han sido descritas con una localización de forma punteada en bandas a lo largo de las miofibras de forma perpendicular a su eje, recordando a la distribución de las estructuras costaméricas que contienen ARN y proteínas (Dubé et al., 2000; Meintjes et al., 2004). Esta disposición muscular también se ha observado tanto en *Danio rerio* (Engels et al., 2004), como en *Xenopus* (Marc-Etienne Huot et al., 2005), indicando de nuevo una función conservada de estas isoformas en la evolución.

El fenotipo de los ratones knockout (KO) de *Fxr1* constitutivos, en los que todas las isoformas de FXR1P fueron eliminadas en todos los tejidos, es letal al nacimiento, probablemente, debido a fallos cardíacos y/o respiratorios secundarios a la pérdida de la estructura arquitectónica de las miofibras. En estos ratones, se ha descrito una deslocalización de proteínas costaméricas como la vinculina, distrofina y α -actinina (Meintjes et al., 2004). En otro modelo de ratón, que expresa niveles muy reducidos de FXR1P, Meintjes et al., 2004, observaron que, aunque estos ratones no presentaban letalidad neonatal, su musculatura estaba muy reducida, lo que conllevaba una pérdida de fuerza muscular, la descoordinación del movimiento al andar, y una reducción del tiempo de vida adulta. Estos dos modelos animales ponen de relieve la importancia de la expresión de *Fxr1* durante el desarrollo para la supervivencia neonatal, así como la necesidad de la expresión de niveles normales de FXR1P para el desarrollo muscular. Igualmente, estudios en *Xenopus*, demostraron que el silenciamiento de *xFxr1* utilizando morfolinós tiene un fuerte impacto en la formación del miotomo, retrasando significativamente la formación de los somitas y disminuyendo la expresión de genes implicados en la miogénesis. Este fenotipo pudo ser rescatado completamente inyectando la isoforma larga de xFxr1p, y en un 50% de los casos al inyectar la isoforma corta (Marc-Etienne Huot et al., 2005). Utilizando de nuevo

morfolinos para silenciar *fxr1*, esta vez en pez cebra, también se obtuvo un fenotipo que mostraba anomalías en el desarrollo y función del músculo cardíaco, así como alteraciones en el músculo estriado y una disminución de la cantidad de distrofina en el miosepto, implicando nuevamente a las proteínas costaméricas en las alteraciones producidas por déficit de expresión de *fxr1* (Van't Padje et al., 2009). Estos experimentos en tres modelos animales diferentes (Marc-Etienne Huot et al., 2005; Meintjes et al., 2004; Van't Padje et al., 2009) demuestran el papel esencial de FXR1P en la miogénesis.

En humanos, el incremento de la expresión de FXR1P se ha asociado con un peor pronóstico en distintos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama y ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC) (Qian et al., 2015). FXR1P también se ha relacionado con la distrofia muscular fascioescapulohumeral (FSDH), una enfermedad con herencia autosómica dominante, cuya etiología se presume que está basada en un splicing erróneo de proteínas específicas de músculo, como *TNNT3* y *MTMRI*, debido a la sobreexpresión del gen *FRG1*, que es un componente de los spliceosomas (L. Davidovic et al., 2008; Gabellini et al., 2006). Davidovic et al., 2008 analizaron el patrón de expresión de FXR1P en mioblastos y miotubos derivados de biopsias de pacientes con FSHD, y observaron una disminución considerable de las isoformas específicas de músculo (iso-e/f) en ambos tipos celulares con respecto a células control, siendo mayor esta disminución en la etapa de miotubo. Algo similar se encontró al analizar un modelo murino de distrofia miotónica (DM1) y en músculo de pacientes con DM1. En estos caso se observó, una disminución de la inclusión de los exones 15-16 en el ARNm de *FXR1* (Orengo et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento, no se había demostrado ninguna enfermedad humana asociada a mutaciones en *FXR1*.

Vía de señalización MAPK quinasas

Las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) median la reacción de las células a estímulos externos, regulando procesos fisiológicos fundamentales como la proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia, expresión génica y motilidad celular (Cargnello & Roux, 2011; Plotnikov et al., 2011).

En mamíferos, se han caracterizado 14 genes *MAPK* que definen 7 rutas distintas. Cuatro de estas rutas MAPK, denominadas canónicas o convencionales, están caracterizadas por presentar tres unidades distintas de proteína quinasa: una MAPK, una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), las cuales funcionan de manera secuencial. Es decir, cada una de estas proteínas es activada por fosforilación por la quinasa anterior y, a su vez, fosforila a la siguiente activándola, generando una cascada de fosforilaciones que culmina con la subsecuente activación de determinados procesos biológicos. La otra característica principal de las MAPK convencionales es la secuencia de su motivo de activación, el cual es fosforilado por la familia MAPKK y corresponde a los residuos Thr-Xaa-Tyr. Las cuatro vías de MAPK canónicas incluyen: las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), p38^{MAPK}, las quinasas

c-Jun N-terminal 1-3 (JNK1-3) y ERK5. Por otro lado, existen tres vías de MAPK atípicas, que comprenden ERK3/4 (también denominadas MAPK6 y MAPK4, respectivamente), ERK7/8 y la quinasa Nemo-like (NLK). Una de las razones por las que se denominan vías MAPK atípicas es porque no está descrito que la organización de estas vías de señalización, para llevar a cabo la respuesta celular, sea la del trío de fosforilaciones (MAPK-MAPKK-MAPKKK) (Coulombe & Meloche, 2007; Moens & Kostenko, 2013). A esto hay que sumarle la presencia de variaciones en los aminoácidos que conforman su motivo de activación. En NLK, la tirosina del dominio de activación Thr-Xaa-Tyr de las MAPK convencionales es sustituida por glicina o glutamato (Kassouf & Sumara, 2020). En ERK3/4 estos tres aminoácidos son sustituidos por el motivo Ser-Glu-Gly, siendo la serina el residuo único fosfoaceptor (Perander et al., 2017). Aunque ERK7 sí presenta el motivo Thr-Glu-Tyr en su dominio de activación, no se ha demostrado que sea sustrato para la familia MAPKK (Abe et al., 2001; Klevernic et al., 2006).

Entre los inductores extracelulares típicos de las cascadas MAPK se encuentran diferentes tipos de estrés ambiental (endotoxinas, estrés osmótico, radiaciones ionizantes, golpes de calor, estrés oxidativo, etc), factores de crecimiento, hormonas, citocinas o mitógenos. Las MAPK están en la base de las cascadas de señalización y para elaborar la correspondiente respuesta celular al estímulo inicial operan fosforilando una amplia gama de sustratos que incluye, entre otros, fosfatasa, factores de transcripción, y las denominadas proteínas quinasas activadas por MAPK (MAPKAPK). En humanos, se han identificado 11 diferentes MAPKAPK que se han dividido en 4 subfamilias. La subfamilia de las quinasas S6 ribosomal (RSK1-4), las quinasas de interacción con MAPK (MNK1/2), las quinasas activadas por mitógenos y estrés (MSK1/2) y las proteínas quinasas activadas por MAPK propiamente dichas (MAPKAPK2/3 y MAPKAPK5). La figura 7 muestra un esquema de las distintas rutas MAPK convencionales y atípicas (Cargnello & Roux, 2011; Kyriakis & Avruch, 2012; Morrison, 2012; Perander et al., 2017; Plotnikov et al., 2011).

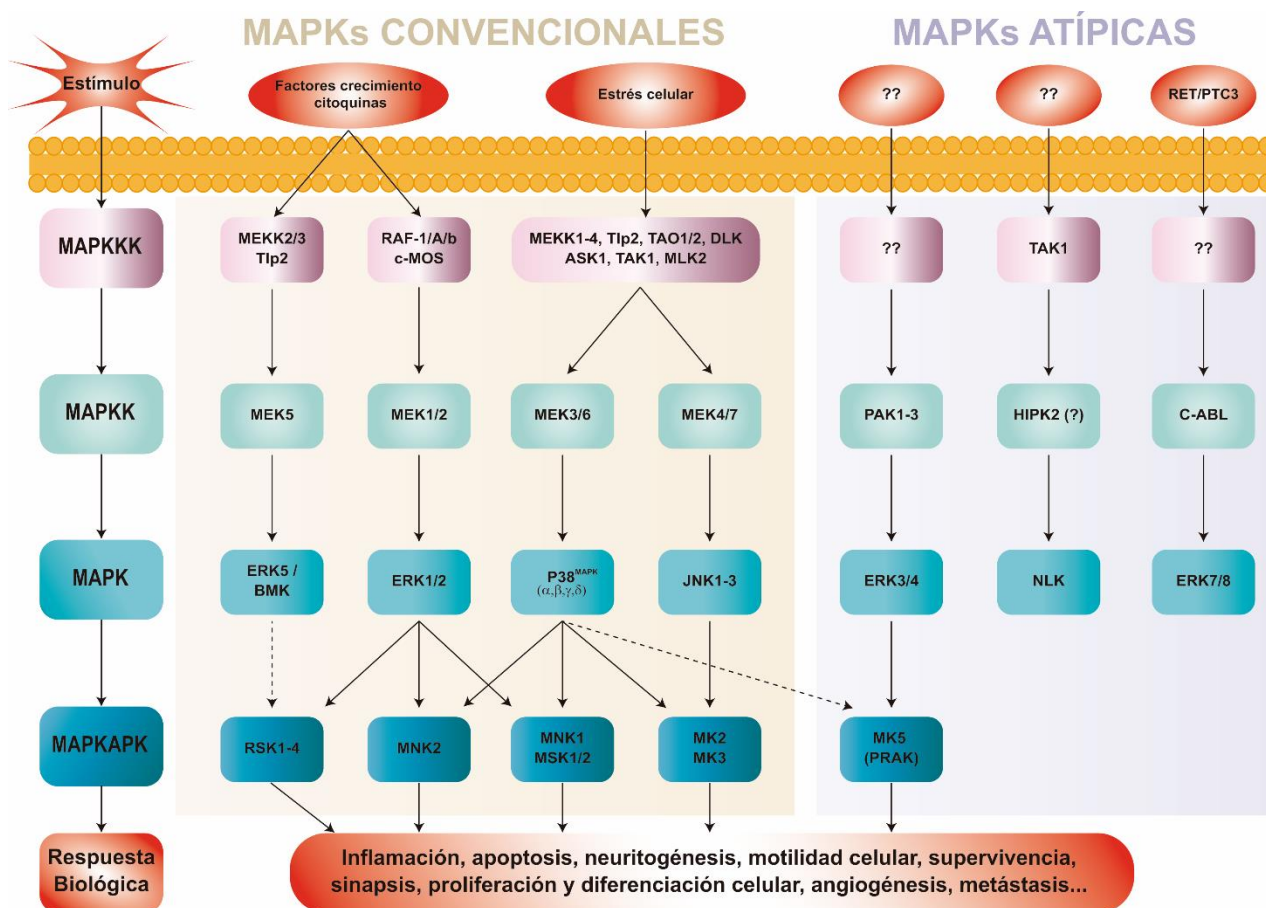


Figura 7: Representación esquemática de las vías de señalización por MAPK. Las vías convencionales MAPK consisten en un bloque de tres quinasas consecutivas que fosforilan y activan a la siguiente; cuando la MAPKKK es fosforilada tras la llegada de un estímulo que desencadena su activación, fosforila la MAPKK, la cual, a su vez, fosforila y activa la MAPK. Entre los sustratos de las MAPK se encuentran las MAPK activadas por proteínas quinasas (MAPKAPK). Las rutas de MAPK convencionales están integradas por las quinasas de la familia MEK (MAPKK), y las MAPK ERK1/2, JNK1-3, p38^{MAPK} y ERK5. Las vías atípicas incluyen las MAPK ERK7/8, NLK y ERK3/4 sin que esté descrito que estas vías se rijan por el bloque de tres fosforilaciones consecutivas entre quinasas. De todas las MAPKAPK descritas, únicamente la MK5 ha sido caracterizada como una proteína que puede ser fosforilada tanto por una vía convencional (p38^{MAPK}), como por una atípica (ERK3/4).

MAPKAPK5

Estructura

La proteína quinasa 5 activada por MAPK (MAPKAPK5; MIM 606723), también designada como quinasa regulada y activada por p38 (PRAK), o MK5, es una quinasa de serina/treonina identificada por primera vez en 1998 como una proteína homóloga a MAPKAPK2 (MK2, MIM 602006), tras una búsqueda de similitud *in silico* en las bases de datos. El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre MK2 y MK5 es del 33% (L New et al., 1998; Ni et al., 1998). El gen que codifica MK5 en humanos (*MAPKAPK5*) se encuentra en la posición cromosómica 12q24.12-q24.13, y consta de 14 exones codificantes que, como consecuencia de splicing alternativo en la unión de los exones 12 y 13, da lugar a dos isoformas proteicas de

471 y 473 residuos. Estas dos isoformas difieren únicamente en la ausencia/presencia de dos aminoácidos (una glicina y una lisina), y no se ha descrito que estos dos residuos formen parte de ningún dominio funcional (Kostenko, Dumitriu, Lægreid, & Moens, 2011). MK5 está presente, y de manera altamente conservada, en la mayoría de los vertebrados, pero no ha sido identificada en *Caenorhabditis elegans* ni *Drosophila*, por lo que se asume que no existe un gen homólogo en invertebrados (Gaestel, 2006; Kostenko, Dumitriu, Lægreid, Moens, et al., 2011). Aunque el ARNm de MK5 se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, la proteína se ha encontrado más abundantemente en cerebro, corazón, pulmones, músculo esquelético y páncreas (Gerits et al., 2009; L New et al., 1998; Ni et al., 1998; Perander, Keyse, et al., 2008).

La estructura de la proteína MK5 incluye un dominio catalítico que comprende desde el aminoácido 20 al 303, con una pequeña región estabilizadora en el extremo Nt. La región Ct contiene una secuencia NES y una NLS, y los dominios de unión a p38^{MAPK} y a ERK3/4 (Moens and Kostenko 2013; Sahadevan and Allen 2017) (Fig. 8).

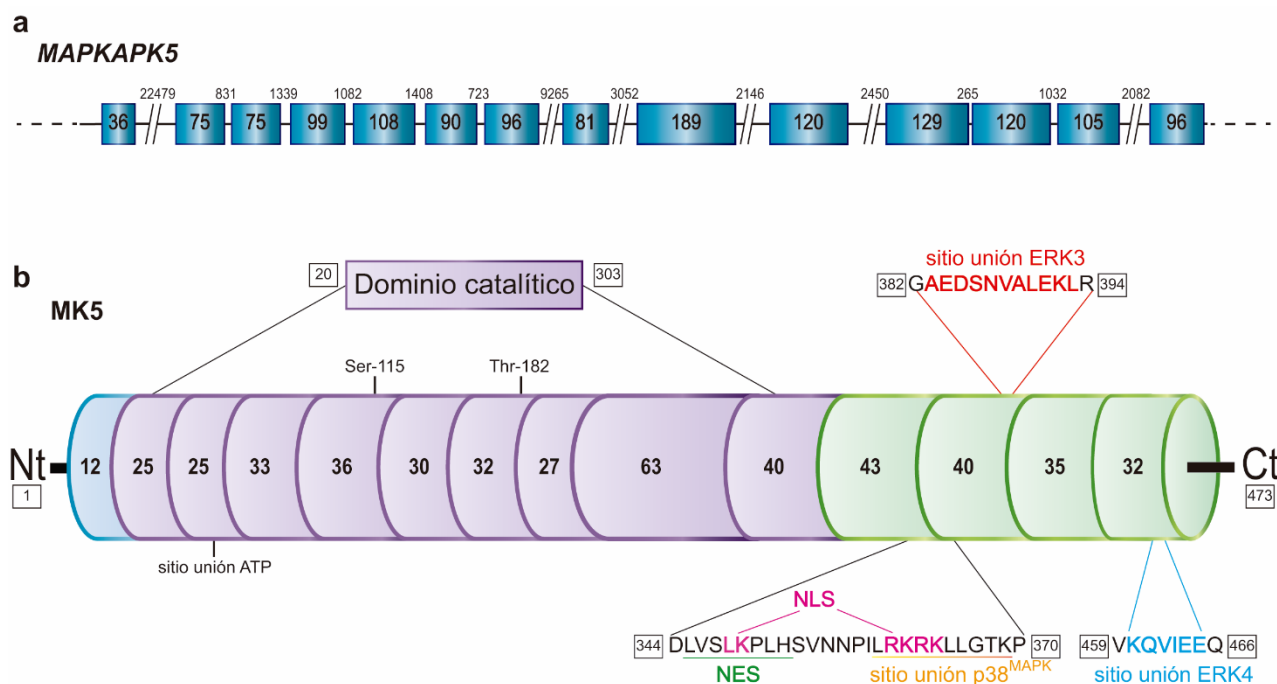


Figura 8: Organización génica y proteica de MK5. a) Representación esquemática del gen *MAPKAPK5*. Los exones están representados por cajas de color azul y los intrones por líneas negras. Los números representan el tamaño, en pares de bases, de los exones e intrones respectivos. b) Representación esquemática de la proteína MK5 humana. Cada exón está representado con una caja diferente. El número dentro de cada exón corresponde al número de aminoácidos. El dominio catalítico está en morado. Se indican el sitio de unión a ATP, las secuencias NES y NLS, el sitio de unión a p38^{MAPK}, el cual se encuentra parcialmente solapado a la secuencia NLS, y los sitios de unión a ERK3 y ERK4. La Thr-182 del dominio de activación por MAPK, y la Ser-115 fosfoaceptora de la Proteína Quinasa A (PKA) están indicadas. Los números recuadrados en negro en ambos extremos representan la posición aminoacídica, siendo el 1 y el 473 el primer y último aminoácido de la proteína respectivamente. Figura basada en los esquemas representados en Moens and Kostenko 2013 y Sahadevan and Allen 2017.

Regulación de la localización subcelular y activación

La existencia de las secuencias NES y NLS en MK5 sugiere que esta proteína puede encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma. Varios estudios han concluido que la localización principal de MK5 es nuclear, y su trasposición al citoplasma depende esencialmente de cambios conformacionales debido a interacciones con otras proteínas (Délérís et al. 2011; Gerits et al. 2007; Hansen, Bartek, and Jensen 2008; Kant et al. 2006; Kostenko and Shiryayev 2011; New, Jiang, and Han 2003; Seternes et al. 2002). Aunque se ha comprobado que varias MAPK convencionales pueden activar MK5 *in vitro* (L New et al., 1998; Ni et al., 1998), únicamente se ha descrito, utilizando cultivos celulares, que p38^{MAPK} y las MAPK atípicas ERK3/4 pueden fosforilar *in vivo* la Thr-182 del dominio de activación de MK5 activándola (Aberg et al., 2009; Åberg et al., 2006; Délérís et al., 2008; Zheng et al., 2011).

Según la literatura existen 4 vías de regulación de la localización subcelular y activación de MK5:

- Mediada por p38^{MAPK}: Se ha descrito que tras la activación de p38^{MAPK}, esta se une a MK5, enmascarando la señal NLS (ver Fig. 8b), lo que favorecería la translocación núcleo-citoplasmática de MK5. Por otro lado, el cambio conformacional producido por la fosforilación en la Thr-182 de MK5, expone la secuencia NES, favoreciendo la exportación núcleo-citoplasmática de MK5 (Liguo New et al., 2003; O. M. Seternes et al., 2002).
- Mediada por ERK3/ERK4: Ha sido demostrado que ERK3/4 se unen a MK5 a través de sus secuencias de unión específicas localizadas en el extremo Ct de MK5 (Fig. 8b), provocando una translocación del núcleo al citoplasma de manera directa, y no debida al enmascaramiento de la NLS como ocurre con p38^{MAPK}. Esta translocación es independiente, tanto de la actividad quinasa de ERK3/4, como de la fosforilación de la Thr-182 de MK5, dado que mutantes catalíticamente inactivos de ERK3, así como de MK5 en la Thr-182, aún pueden ser translocados fuera del núcleo cuando ambas proteínas son coexpresadas. (Aberg et al., 2009; Åberg et al., 2006; Délérís et al., 2011; Kant et al., 2006; Schumacher et al., 2004; O.-M. Seternes et al., 2004). El mecanismo de activación de MK5 a través de ERK3 aún no está del todo establecido. Mutantes catalíticamente inactivos de ERK3 mantienen su capacidad de activar MK5 (Schumacher et al., 2004; O.-M. Seternes et al., 2004), sugiriendo que ERK3 genera un cambio conformacional en MK5 tal que induce su autofosforilación. El laboratorio del Dr. Gaestel propuso que la activación de MK5 por mutantes inactivos de ERK3 podría estar mediada a través del reclutamiento de ERK4, ya que ambas MAPK atípicas pueden formar heterodímeros (Kant et al., 2006). A diferencia de lo que ocurre con ERK3, la activación de MK5 mediada por ERK4 se realiza de forma directa y no intervendría la autofosforilación de la Thr-182 (Åberg et al., 2006; Schumacher et al., 2004). Aunque la regulación y activación de ERK3/4 aún no está completamente esclarecida, se ha comprobado que las quinasas del grupo 1 activadas por p21 (PAK) son capaces de activar ERK3/4 mediante fosforilación en las Ser-189 y Ser-186 respectivamente (Fig. 7), provocando con esto la subsecuente fosforilación y

activación de MK5 tanto *in vitro* como *in vivo* en cultivos celulares (De la Mota-Peynado et al., 2011; Délérís et al., 2011). Es importante destacar también, que entre ERK3/4 y MK5 existe una regulación recíproca. Se ha demostrado que ERK3 y MK5 son necesarias mutuamente para mantener sus niveles de expresión, viéndose disminuida la expresión de una proteína en ausencia de la otra (Schumacher et al., 2004; O.-M. Seternes et al., 2004). En relación a ERK4, la coexpresión de MK5 incrementa la fosforilación de la Ser-186 de ERK4, sugiriendo que la unión de MK5 previene la desfosforilación y facilita la actividad quinasa de ERK4 (Perander et al., 2017; Perander, Åberg, et al., 2008).

- Mediada por CDC14A: la proteína fosfatasa específica dual CDC14A también regula la translocación del núcleo al citoplasma de MK5 a través de un mecanismo, que, aunque aún no está del todo definido, es independiente de su actividad fosfatasa. Aunque CDC14A interacciona con ERK3 en un modelo de cultivo celular, siendo uno de sus sustratos, se ha demostrado que la regulación de la localización de MK5, a través de CDC14A, no puede explicarse por un incremento en la formación de complejos MK5-ERK3 ni por la estabilización de ERK3 (Hansen et al., 2008).
- Mediada por proteína quinasa A (PKA): la subunidad catalítica α de la PKA media la exportación nuclear de MK5, mediante la fosforilación de la Ser-115 situada en el dominio catalítico (Fig.8b). Para ello, es necesaria la función quinasa de PKA, así como la de MK5, ya que mutaciones en la Thr-182 de MK5, así como mutantes sin actividad quinasa, impiden la translocación al citoplasma de MK5 mediada por PKA. Se ha comprobado también, que la interacción con PKA aumenta la actividad quinasa de la MK5 sobre sus sustratos (Gerits et al., 2007; Kostenko et al., 2009; Kostenko & Shiryaev, 2011).

Sustratos y Función biológica de MK5

Diversos estudios han identificado una serie de proteínas que interactúan y/o pueden actuar como sustratos de MK5. Sin embargo, no todos lo hacen *in vivo* y/o se conoce la funcionalidad de dicha interacción (Tabla 2). En la figura 9 se describen los principales sustratos de MK5, actualmente conocidos, organizados en base al papel fisiológico otorgado a su interacción con MK5. A continuación, se describe la función biológica de MK5 según la literatura actual:

➤ Remodelación de los filamentos de actina

La remodelación del citoesqueleto de actina está involucrada en funciones celulares esenciales como la migración y el mantenimiento de la morfología celular, así como en situaciones fisiopatológicas. Este proceso está regulado por la proteína HSP27, una chaperona que actúa uniéndose a los monómeros de actina (actina globular) impidiendo su polimerización y la formación de filamentos de actina. La fosforilación de HSP27 por MK5 provoca su disociación de la actina monomérica, pudiendo ahora esta última ser utilizada en la formación de filamentos de actina (Fig. 9) (Gaestel, 2006; L New et al., 1998; Shiryaev & Moens, 2010).

➤ Supresor/promotor de tumores y angiogénesis

MK5 ha sido propuesta como una proteína con papel de supresor de tumores actuando a distintos niveles. Se ha demostrado que la interacción entre ERK3 y MK5 retiene el complejo en el citoplasma evitando que ERK3 interacte con la ciclina D3, impidiendo de esta manera la progresión del ciclo celular (Hansen et al., 2008). Por otro lado, ha sido publicado que la fosforilación de la Ser-37 de p53 por MK5, provoca el incremento de la expresión de p21^{CIP1/WAF1} suprimiendo la proliferación celular (Chen et al., 2000; Sun et al., 2007). Otras formas en las que MK5 actuaría como supresor de tumores, es antagonizando la activación oncogénica de la vía JNK inducida por H-RAS (Kostenko et al., 2012), y a través de su interacción con FOXO3a que conduce finalmente a la reducción de los niveles proteicos c-MYC (Kostenko et al., 2012; Kress et al., 2011). MK5 disminuye también la proliferación celular a través de la fosforilación de la pequeña GTPasa RHEB, disminuyendo su capacidad de unión a GTP, lo que conduce a la inhibición de mTORC1, deteniendo el crecimiento celular (Zheng et al., 2011) (Fig. 9).

En contraposición, recientemente se ha determinado que MK5 interactúa con la proteína oncogénica YAP, siendo la actividad quinasa de MK5 esencial para proteger a YAP de la degradación mediada por ubiquitina. Estudios con un modelo de xenoinjerto de células tumorales en ratones, comprobaron que la inhibición de MK5 conduce a una reducción de la estabilidad de la proteína YAP, traduciéndose en una supresión del crecimiento tumoral (Seo et al., 2019) (Fig. 9).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) estimula la reorganización del citoesqueleto de las células endoteliales promoviendo angiogénesis, y, en consecuencia, la progresión tumoral. MK5 parece intervenir en este proceso, ya que se ha descrito que la unión de VEGF a su receptor de tipo 2, provoca la activación de MK5 a través de la vía p38^{MAPK}. Subsecuentemente, MK5 fosforila la quinasa de adhesión focal (FAK) determinante en la regulación del citoesqueleto y la migración celular (Yoshizuka, Chen, et al., 2012; Zhao & Guan, 2011) (Fig. 9).

➤ Neurogénesis y secreción neuronal

MK5, a través de su activación por ERK3, podría estar implicada en procesos de secreción neuronal ya que se ha comprobado la fosforilación *in vitro*, por parte de MK5, de la tirosina hidroxilasa (TH), proteína clave en la síntesis de catecolaminas (Toska et al., 2002) y de Septin 8 (SEPT8) (Shiryaev et al., 2012), proteína implicada en el transporte de vesículas y liberación de neurotransmisores. También se ha relacionado a MK5 en procesos de regulación del citoesqueleto y plasticidad neuronal a través de la formación de espinas dendríticas en neuronas mediante de la formación del complejo terciario SEPT7-ERK3-MK5 (Brand et al., 2012) (Fig. 9).

➤ Funciones cardíacas

En el corazón de ratón adulto, la proteína MK5 se expresa en fibroblastos ventriculares pero no en miocitos ventriculares (Nawaito et al., 2017). Esta descrito que la haplodeficiencia de MK5 en ratones disminuye la

progresión de la hipertrofia de corazón durante la remodelación del miocardio, en respuesta a una subida de presión crónica. También se han observado alteraciones en los niveles de proteínas de la matriz extracelular en fibroblastos cardíacos (Ali et al., 2019; Nawaito, Sahadevan, Clavet-Lanthier, et al., 2019). Aunque no se ha comprobado que MK5 tenga ningún efecto beneficioso ni perjudicial para la viabilidad, el grado de dilatación del ventrículo derecho, o la disfunción sistólica 8 días post-infarto de miocardio en ratón, la haplodeficiencia de MK5 disminuye el tamaño del infarto, aumentando la neovascularización en el perímetro de la zona infartada, reduciendo el tamaño de la cicatriz y el contenido de colágeno. La migración y proliferación de fibroblastos cardíacos es un punto importante en relación a la cicatrización de lesiones. Se ha demostrado que la migración disminuye en fibroblastos cardíacos aislados de ratones knockout para MK5, en comparación con ratones wt o haplodeficientes para esta proteína, deduciendo que MK5 tiene una función clave en la regulación de la fibrosis reparativa en corazón (Nawaito et al., 2017; Nawaito, Sahadevan, Clavet-Lanthier, et al., 2019; Nawaito, Sahadevan, Sahmi, et al., 2019) (Fig. 9).

Si bien, según la literatura, MK5 está involucrada en distintos procesos fisiológicos, hasta el momento de la realización de esta tesis doctoral, no se había descrito ninguna enfermedad asociada a mutaciones en este gen.

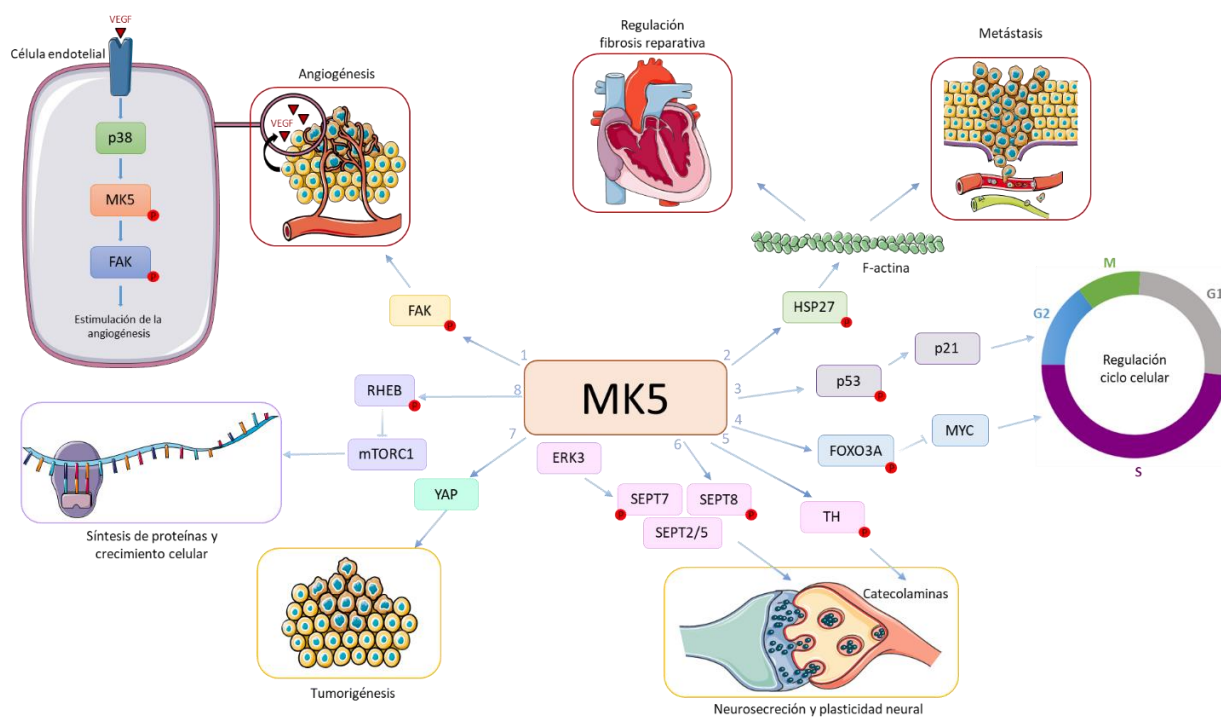


Figura 9: Representación esquemática de las funciones atribuidas hasta el momento a MK5. 1. MK5 estimula la angiogénesis a través de la fosforilación de FAK. 2. MK5 fosforila a HSP27 permitiendo la formación de filamentos de actina, lo que tiene un papel importante en la remodelación del citoesqueleto y la motilidad celular. 3-4. MK5 inhibe la progresión del ciclo celular a través de la activación de p53, y en consecuencia de p21 y a través de la inhibición de MYC. 5. MK5 fosforila la tirosina hidroxilasa (TH), enzima encargada de la síntesis de catecolaminas. 6. MK5 fosforila SEPT8, formando parte de la neurosecreción. El complejo ERK3-MK5 interacciona con SEPT7, proteína implicada en la plasticidad neuronal a través de la formación de espinas dendríticas. 7. MK5 interacciona con YAP, proteína que promueve la tumorigénesis. 8. MK5 fosforila RHEB, inhibiendo mTORC1, lo que impide la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Esquema basado en la figura 5 de Moens and Kostenko 2013. Figura creada con imágenes obtenidas a través de <https://smart.servier.com/>



OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis consistió en identificar los genes responsables de dos enfermedades congénitas que cursan con diferentes alteraciones del desarrollo, y caracterizar en cada caso la patología asociada. A partir de esta premisa se elaboraron los siguientes objetivos específicos:

1. **Estudio genético mediante secuenciación de exoma (WES), en pacientes no diagnosticados de dos familias distintas, para identificar las variantes génicas causantes de enfermedad.** Como resultado de este estudio se identificaron mutaciones bialélicas en el exón 15 de *FXR1* en una familia y en *MAPKAPK5* en la otra.
2. **Caracterización de la historia natural de un nuevo tipo de miopatía congénita multi-minicore, resultante de mutaciones recesivas situadas en el exón 15 de *FXR1*.** Este objetivo se dividió en varias partes.
 - 2.1. **Determinación del efecto de mutaciones en el exón 15 de *FXR1* en la expresión y distribución celular de las isoformas de FXR1P en células en cultivo de un individuo afectado.**
 - 2.2. **Análisis del fenotipo musculoesquelético de dos líneas de ratón generadas por tecnología CRISPR-Cas9, portadores de mutaciones distintas en el exón 15 de *Fxr1* (*Fxr1*-CRISPR-Cas9).** Este objetivo fue diseñado para investigar la patogenicidad de las mutaciones en el exón 15 de *Fxr1* y determinar si fenocopian la enfermedad humana.
 - 2.3. **Correlación entre el fenotipo miopático de cada línea murina *Fxr1*-CRISPR-Cas9 con la expresión y localización de las iso-e/f de FXR1P.** Este punto estaba dirigido a comprender las diferencias fenotípicas existentes entre distintas mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*.
 - 2.4. **Análisis del perfil de expresión de ratones con mutación en el exón 15 de *Fxr1*.** La intención de este objetivo fue aclarar las vías moleculares en las que están implicadas las iso-e/f de FXR1P, mediante un estudio del transcriptoma del músculo esquelético de ratones con mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*.
3. **Estudio funcional de mutaciones en *MAPKAPK5* como causa de un nuevo tipo de trastorno del desarrollo que implica alteraciones neurológicas, cardíacas y faciales junto con simpolidactilia.** Durante el desarrollo de este objetivo se realizó un análisis de los niveles de expresión de la proteína codificada por *MAPKAPK5* (MK5) y su proteína interaccionante ERK3, así como un estudio de remodelación del citoesqueleto de filamentos de actina en fibroblastos primarios, con la finalidad de determinar si la alteración funcional de MK5 podría ser determinante en este proceso.



MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras humanas

Todos los pacientes, o sus tutores legales dieron consentimiento informado escrito para participar en este estudio, la donación de muestras, acorde con la declaración de principios de Helsinki de investigación médica en seres humanos, y para la publicación de información clínica, hallazgos moleculares y fotografías. Todos los estudios fueron aprobados por los Comités de Ética del Centro de Excelencia para la Genética Humana, El Cairo, Egipto, el Hospital Universitario La Paz y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Análisis genético

Los estudios de mapeo de homocigosidad se realizaron mediante hibridación de ADN genómico (ADNg) con arrays de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de genoma completo usando matrices CytoSNP-850k BeadChip (Illumina) como se indica en Palencia-Campos et al. 2017. La secuenciación de exoma mediante secuenciación de nueva generación (WES) de los probandos de la familia 1 y 3 fue encargada a Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). Básicamente, la captura de ADN se realizó con el kit SureSelect Human All Exón Target Enrichment para 51 Mb (Agilent Technologies) y las lecturas se alinearon contra el genoma humano GRCh37/hg19. El filtrado inicial se realizó con Picard-tools (<http://broadinstitute.github.io/picard>) y SAM-tools (H. Li et al., 2009) y se obtuvieron varias variantes usando la combinación de VarScan (Koboldt et al., 2009) y GATK (McKenna et al., 2010). Las variantes identificadas se anotaron utilizando la base de datos Ensembl (www.ensembl.org). Las variantes fueron filtradas en función de la frecuencia del alelo menos común (MAF) con respecto a las bases de datos poblacionales (ausente o $<0,01$ en 1000G), por su presencia en regiones de homocigosidad y por predicción funcional (sin sentido, cambio de sentido, indel o variante de splicing). La sistemática de filtrado de variantes utilizada en el probando de la familia 1 se especifica en la tabla 3.

Secuenciación Sanger

Las regiones codificantes y las regiones intrónicas flanqueantes de los exones correspondientes de *FXR1* y (familia 1) y *MAPKAPK-5* (familia 3) fueron amplificadas a partir de ADN genómico (ADNg) extraído de sangre periférica, mediante la utilización de kits comerciales (QIAmp® DNA, QIAGEN). En el caso de *SPG11* (familia 1) se aisló ARNm a partir de fibroblastos primarios, y se sintetizó ADNc utilizando random primers y SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher), siguiendo las especificaciones del fabricante, amplificándose posteriormente la región codificante del exón correspondiente. Todas las muestras fueron tratadas con ExS-Pure (Nimagen) y secuenciadas por el método clásico de Sanger en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIBM) o Eurofins

Genomics. Los cromatogramas resultantes fueron analizados utilizando el programa informático Sequencher (Gene Codes Corporation).

Cultivos celulares

Los mioblastos primarios humanos se aislaron a partir de una biopsia muscular (cuádriceps femoral, cabeza medial) y se cultivaron siguiendo el protocolo descrito en Stern-Straeter et al. 2008. Brevemente, el tejido muscular se fragmentó mecánicamente y se incubó a 37°C/5% de CO₂ con colagenasa de tipo I (Sigma)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) al 0,2 % durante 1 hora, seguido de otro paso de incubación en tripsina al 0,05% (Gibco)/Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) durante 30 minutos a 37°C/5% de CO₂. La muestra digerida se filtró a través de un filtro de nylon estéril de 100 µm (Corning®), y se sembró en placas pre-tratadas con gelatina al 0,2 % en medio de crecimiento (Ham's F10 + 20% Suero Fetal Bovino (FBS) + 1% penicilina /estreptomicina (P/S); (Gibco)). En todos los experimentos se utilizaron mioblastos primarios de 4-7 pases. Los miotubos diferenciados se obtuvieron manteniendo mioblastos con un 90% de confluencia en medio de diferenciación (Ham's F10 + 2% suero de caballo (HS, Gibco) + 1% P/S) durante 5 días.

Los fibroblastos primarios se generaron a partir de una biopsia de piel después de digerir el tejido en 0,05% de tripsina/búfer salino fosfato (PBS) durante 30 minutos a 37°C/5% de CO₂ y se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM + 10% FBS +1% P/S). Las líneas de fibroblastos primarios control se obtuvieron comercialmente y se cultivaron en medio de crecimiento. C1: Lonza Basel, Switzerland, cc2509 (neonatal); C2: Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 106-05N (neonatal); C3: Lonza, cc2511 (adulto).

Los mioblastos primarios de ratón se aislaron de paquetes musculares de las extremidades inferiores de ratones de 2-3 meses y se cultivaron siguiendo las mismas condiciones experimentales indicadas para mioblastos humanos, excepto que los mioblastos de ratón se sembraron en placas recubiertas con matrigel (Corning; 356234). Previamente, los mioblastos de ratón se colocaron en placas Petri no recubiertas durante 1 hora con el fin de descartar las células que se adhirieron rápidamente a placa, correspondientes a fibroblastos contaminantes.

Las células HeLa y HEK293T se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM + 10% FBS +1% P/S). Ambas líneas celulares fueron autenticadas en el Servicio de Genómica del IIBM a través del método StemElite ID (Promega).

Todas las líneas fueron testadas para micoplasmas por el Servicio de Cultivos del IIBM, confirmando que se encontraban libres de contaminación.

Inmunoblot

Los tejidos musculares se homogeneizaron usando un ULTRA-Turrax T10 básico (IKA) en tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM, EDTA 2mM, 0.5% deoxicolate de sodio, 0.1% SDS, 1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma P8340, 1mM PMSF) y fosfatasas (Sigma P0044 and P5726, 1mM Na₂O₄V and 10mM NaF). Después de una etapa de incubación de 20 minutos en hielo, el extracto homogeneizado se sonicó en un baño frío (Diogenode Bioruptor®) a potencia máxima durante 1 minuto, y se clarificó por centrifugación a 4°C (15 minutos, 14.000 g). El sobrenadante de estos lisados se consideró como la fracción soluble (SF), y la fracción insoluble (IF) se disolvió durante 30 minutos en urea 8M en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas y, posteriormente, se sometió a sonicación (3 ciclos de 1 min) en baño frío. La cuantificación de proteínas se realizó con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Las muestras de proteínas (30-40 µg) se separaron mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare Life Science) y se sometieron a WB. En el caso de cultivos primarios relacionadas con *FXR1*, tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron durante 5 minutos a 37°C/5%CO₂. Posteriormente, se inactivó la tripsina con medio de cultivo correspondiente, y las células se centrifugaron a 1.500 rpm 5 minutos, se lavaron con PBS frío y se volvieron a centrifugar a 1.500 rpm 5 minutos para, finalmente, ser lisadas en tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. A continuación, los extractos se incubaron 20 minutos en hielo y se clarificaron a 4 °C (15 minutos, 14.000 g). El sobrenadante de estos extractos se consideró como SF, y el precipitado (IF) se disolvió durante 30 minutos en urea 8M en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas y posteriormente se sonicó (3 ciclos de 20 segundos). Estos extractos se trataron posteriormente de la misma manera que los obtenidos de los lisados tisulares. En el caso de fibroblastos primarios relacionados con la línea experimental de MK5, estas células se sembraron en placas Petri p100 y se incubaron hasta confluencia a 37°C, 5% CO₂ en medio de crecimiento. La lisis, asilamiento de proteínas, y el resto del procedimiento, se realizó como se ha descrito anteriormente, salvo que en este caso únicamente se utilizó la fracción soluble de la muestra, y se analizaron 30 µg de proteína total en el gel. Los extractos proteicos de líneas celulares HEK293T se realizaron como se ha explicado para cultivos primarios relacionados con *FXR1*.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los que se indican a continuación: FXR1P todas las isoformas (Proteintech, 13194-1-AP, 1:4.000; #ML13 (Mazroui et al., 2003) suero 1:10.000), FXR1P específico para iso-e/f (#27-15 y #27-17 suero policlonal, 1:4.000) (Dubé et al., 2000), α -actinina (Millipore 05-384, 1:4.000), MHC (R&D systems MAB4470, 1:10.000), α -tubulina (Sigma T9026, 1:20.000), vinculina (Santa Cruz sc-73614, 1:1.000), caspasa-3 (Cell Signaling #9665, 1:1.000), caspasa-3 activa (Cell Signaling #9661, 1:500), CDK1NA (Santa Cruz sc-397, 1:500), ANKRD1 (Proteintech 11427-1-AP, 1:1.000), Triadina (Thermofisher MA3-927, 1: 1.000), SLN (1:100) (Desmond et al., 2017), GFP (Santa Cruz sc-9996, 1:1000), MK5 (Cell Signaling #7419, 1:1.000) y ERK3 (Cell Signaling #4067, 1:1.000). Los anticuerpos frente a FXR1P (#ML13, #27-15 y #27-17) y el anticuerpo frente a sarcoplipina fueron cedidos amablemente por E.W.

Khandjian y Robert J. Bloch, respectivamente. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch (1:10.000). Los inmunoblots se revelaron usando el reactivo ECL (Amersham) y se expusieron en películas radiográficas Agfa X-Ray. La capacidad de los anticuerpos anti-FXR1P Proteintech 13194-1-AP y #27-15 para reconocer las isoformas musculares de FXR1P se demostró utilizando extractos proteicos de células HEK 293T transfectadas con EGFP::FXR1-iso c (Fig. 34b).

Ratones transgénicos

Los ratones fundadores editados en el exón 15 de *Fxr1* fueron generados por la empresa genOway (Francia), mediante la tecnología CRISPR-Cas9, con el objetivo de mimetizar la delección de 4 pares de bases ACAG, correspondiente a la familia 1. Los ratones nacidos tras la correspondiente microinyección de reactivos CRISPR en oocitos fertilizados fueron testados por PCR, y la secuencia de *Fxr1* amplificada fue analizada para evaluar la presencia de mutación. Se seleccionaron tres fundadores a partir de los cuales se generaron tres líneas de ratón, dos con la delección deseada de 4 pb (ratón delACAG, NM_001113188.1:c.1764_1767delACAG) y una tercera portadora de una duplicación de una adenina en el exón 15 de *Fxr1* (ratón dupA, NM_001113188.1:c.1766dupA), obtenida como un subproducto resultante de la aplicación de esta técnica. Las tres líneas de ratón CRISPR se mantuvieron de manera independiente en un fondo genético C57BL/6J cruzando machos heterocigotos con hembras wt. Los descendientes heterocigotos de estos cruces se utilizaron para generar ratones homocigotos para cada mutación y wt con los que se realizaron los procedimientos. Las dos líneas mutantes delACAG fueron analizadas de forma independiente y, tras confirmar que producían resultados idénticos, se usaron sin distinción. Del mismo modo, se confirmó que el fenotipo de las tres líneas CRISPR no variaba en función del sexo de los animales, utilizándose hembras para los estudios funcionales e histopatológicos y ambos sexos, de manera indistinta, en el aislamiento de fibras musculares y cultivos primarios de mioblastos. Los experimentos se realizaron con ratones descendientes de cruces entre heterocigotos desde F2 a F5 sin encontrar ninguna diferencia en los fenotipos.

Los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con la normativa ética de experimentación animal y fueron aprobados por los comités de ética correspondientes del IIBM, el CSIC y de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Pruebas de rendimiento funcional

Los análisis de fuerza y resistencia muscular se llevaron a cabo en ratones hembra de 14 semanas de edad usando tres pruebas diferentes: ejercicio sostenido en rotarod, prueba de peso y el test “hanging wire”. El ensayo de ejercicio sostenido o fatiga se realizó utilizando un instrumento Rotarod 47600 (Ugo Basile, Italia) de acuerdo a las instrucciones descritas en Carrell et al. 2016. Brevemente, previo a la realización de la prueba se entrenó a los animales durante 3 días, realizando 4 ensayos de un minuto a 24 rpm cada día. Al cuarto día,

se realizan dos entrenamientos de un minuto con distintas velocidades: 5, 8, 15, 20, 24, 31, 33 y 37 rpm. Tras dejar descansar a los animales durante 3 días, se realizó el ensayo de fatiga que se divide en 3 etapas sin paradas entre ellas: primera, manteniendo una velocidad constante de 15 rpm durante 15 minutos; segunda, incrementando la velocidad 1 rpm cada 5 minutos hasta llegar a un máximo de 21 rpm; tercera, manteniendo una velocidad constante de 22 rpm durante 15 minutos. En todas las etapas se anotó el número de caídas que acumula cada ratón y el tiempo de latencia, volviendo a posicionarlo sobre la rueda después de cada caída. Se calcula el número de caídas acumuladas durante el tiempo total que dura el ensayo de fatiga.

Para la prueba de peso se fabricaron 5 pesos diferentes consistentes en una bola de 7 g de hilo metálico de 0,33 mm de espesor, a la que se adjuntó de 1 a 5 pareja de eslabones (grande+pequeño) de cadena de acero con un peso de 12 g cada pareja. Los pesos finales fueron: 19, 31, 43, 55 y 67 g (Fig. 10). La prueba de peso se realizó siguiendo el protocolo explicado por Deacon 2013 y se repitió durante 3 días consecutivos en cada ratón. Cogiendo al ratón por la base de la cola, se le posiciona sobre la bola metálica que lleva unido el peso menor, permitiendo que la agarre únicamente con las patas delanteras. Se levanta al animal y se cuentan 3 segundos. Si el ratón ha soportado el peso, se pasa al siguiente peso. Si ha soltado el peso, se anota el tiempo al que lo ha soltado. Cada peso se repite un total de 3 veces, dejando 10 segundos de descanso entre intentos y entre distintos pesos. La puntuación final se calcula multiplicando el número de eslabones de la cadena más pesada que es capaz de sostener el animal durante 3 segundos por el tiempo (3 segundos) que la ha mantenido sostenida. En el caso de que el ratón consiguiera soportar un peso menos de 3 segundos en los tres intentos de ese peso, a la puntuación final se le suma el tiempo que ha sido capaz de aguantar dicho peso.



Figura 10: Imagen de los pesos fabricados para la prueba de rendimiento funcional. Se fabricaron 5 pesos diferentes consistentes en una bola de 7 gramos de hilo metálico de 0,33 mm de espesor, a la que se adjuntó de 1 a 5 pareja de eslabones (grande+pequeño) de cadena de acero con un peso de 12 gramos cada pareja. Los pesos finales fueron: 19, 31, 43, 55 y 67 gramos. La prueba de peso se realizó siguiendo el protocolo explicado por Deacon 2013 y se repitió durante 3 días consecutivos en cada ratón.

El test “hanging wire” se realizó de acuerdo con el procedimiento operativo estandarizado descrito por Putten 2016 utilizando el método “falls and reaches”. Para esta prueba se coloca a los animales en el centro de una varilla metálica de 2 mm de grosor y 55 cm de largo, a la que se sujeta únicamente por las patas delanteras. Durante el tiempo que dura el test (180 segundos) se cuenta el número de veces que el animal cae (parámetro “caídas”) o es capaz de llegar a uno de los extremos de la varilla (parámetro “llegadas”). Además de estos parámetros descritos por Putten 2016, en esta tesis se introdujo un nuevo parámetro que se denominó “cuatro extremidades”, en función de la cantidad de veces que el ratón fue capaz de levantar las extremidades posteriores y agarrar el cable con las cuatro extremidades. Este parámetro “cuatro extremidades”, al igual que el de “llegadas”, comienza desde cero y aumenta en 1 cada vez que ocurre un evento de este tipo, en un total de 180 segundos que dura la prueba y hasta una puntuación máxima de 10. El parámetro “caídas” tiene una puntuación inversa, comenzando en 10 y descontando 1 cada vez que ocurre un evento de este tipo. El test termina cuando la puntuación en “caídas” llega a 0, o cuando termina el tiempo del test. Mientras tanto, el ratón se vuelve a posicionar en el centro de la varilla cada vez que cae o llega hasta un extremo de la barra.

El estudio de pisada y coordinación, se realizó a través de un test de huella (footprint) según está descrito en Báñez-López et al. 2014. Para esta prueba, se utilizó pintura no tóxica, lavable con agua, de color rojo y verde para pintar las patas traseras y delanteras respectivamente. La prueba se realizó en un corredor de madera de 60 cm de largo x 7 cm de ancho, colocando una caja oscura al fondo del túnel y hojas de papel blanco de 50 cm de largo en la base. Se consideró como carrera válida aquella en la que se obtenía una buena visualización para la medición de los diferentes parámetros, en un mínimo de tres zancadas seguidas, tras excluir las huellas del inicio y final del movimiento. Los parámetros analizados fueron la longitud de zancada de las extremidades posteriores y anteriores, el ancho de base de las extremidades posteriores y anteriores, el solapamiento, determinado por la superposición de las extremidades posteriores y anteriores, y el tiempo tardado en recorrer el túnel (Fig. 19d).

Resonancia magnética (MRI)

El examen de MRI en ratones se realizó en hembras de 14 semanas de edad, en un Bruker Biospect 7.0T de calibre 16 cm (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania) a través del Servicio de Imagen y Espectroscopía por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC) del IIBM. Los ratones se mantuvieron anestesiados con 1-2% de isoflurano en 1 litro de oxígeno a lo largo del experimento, en el que se obtuvieron imágenes anatómicas de secuencias potenciadas en T2 con una adquisición rápida en orientaciones axiales y coronales con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) = 3000 ms, tiempo de eco (TE) = 11,57 ms, factor RARE = 8, Av = 12, campo de visión = 2,5cm, matriz de adquisición = 256 x 256 correspondiente a una resolución en el plano de 97 x 97 μm^2 , grosor de corte = 1 mm sin espacio entre cortes. Para calcular el volumen muscular se midió, en cada ratón, el área muscular de 5 secciones consecutivas de cada una de las extremidades posteriores, comenzando 2 secciones después de la meseta tibial (zona de unión fémur-tibia).

El valor del volumen muscular de cada animal fue la media de ambas extremidades multiplicada por el grosor total.

Ab sociometría de rayos X de energía dual (DEXA) y rayos X

La densidad mineral ósea (DMO, $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*, se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Gabriel Herrero-Beamont y la Dra. Raquel Largo de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid). Se evaluó en ratones hembra anestesiados de 4 meses de edad mediante DEXA utilizando PIXImus (GE Lunar Corp., Madison, WI, EE.UU) como se describe anteriormente (Roman-Blas et al., 2017). Este parámetro se midió en el ROI seleccionado (región de interés, cm^2) en las vértebras L4-L5 (35 x 23 píxeles) y fémur (11x33 y 17x13 píxeles), los cuales definen los valores de hueso trabecular y cortical respectivamente.

Para las radiografías, se diseccionaron las extremidades anteriores y posteriores de ratones hembra de 3,5-4 meses de edad y se les despojó de tejido muscular antes de analizarlos. En cada experimento independiente, las extremidades de animales de la misma camada de todos los genotipos, se colocaron juntas y se adquirieron imágenes de rayos X simultáneamente en la misma película radiográfica (Agfa X-Ray), usando un instrumento HP Faxitron 43855A con una intensidad de 12KV durante 10 segundos. Las películas fueron fotografiadas posteriormente.

Histopatología

Para el análisis microscópico de los ratones CRISPR, se diseccionaron los músculos vasto lateral, gastrocnemio y sóleo de ratones hembra de 3 meses de edad, los cuales se incluyeron juntos en resina para criostato OCT (TissueTeck®, Sakura) y se congelaron sumergiéndolos en isopentano preenfriado con N_2 líquido. A continuación, se realizaron secciones transversales conteniendo los tres músculos, de 10 μm de grosor al criostato y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E), o se usaron para la tinción histoenzimática NADH-TR y ATPasa a pH 4,3 siguiendo los procedimientos estándar. La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio Axiophot Zeiss acoplado a una cámara Olympus DP70 y al “software” DP Controller (Olympus). Las secciones transversales H-E del vasto lateral se utilizaron para cuantificar el número de células/campo de visión del microscopio (375,56 x 282,78 μm), el tamaño de las células expresado por el diámetro mínimo de Feret (MFD) y el porcentaje de fibras con núcleos centralizados. Para cada ratón, se contaron 3 imágenes independientes de la misma crio sección. La frecuencia relativa del MFD (%) de cada genotipo se determinó utilizando intervalos de longitud de 5 μm . La tinción histoenzimática ATPasa (pH 4,3) se usó para la cuantificación de fibras tipo 1 en una sección transversal completa del músculo sóleo de cada ratón.

Microscopía electrónica de transmisión de tejido de ratón y miotubos diferenciados

Las muestras de gastrocnemio de ratones hembra de 3 meses de edad se fijaron en 1% glutaraldehído/4% PFA en tampón cacodilato 0,1 M toda la noche (O/N), se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% en agua durante 60 minutos y se deshidrataron a través de una serie de soluciones de etanol y acetona. Después de la última etapa de deshidratación, las muestras se incubaron en una mezcla 1:3, 1:1, 3:1 de resina durcupan y acetona y se incubaron a 60°C durante 48 horas. A continuación, se obtuvieron secciones longitudinales ultrafinas (50-60 nm) con una cuchilla de diamante (Diatome) en un ultramicrotomo (Leica Reichert ultracut S) y se recogieron en rejillas de cobre de malla de 200-mesh. Las secciones se contratiñeron con acetato de uranilo al 2% en agua durante 20 minutos seguido de una etapa de incubación de 10 minutos con una solución de citrato de plomo. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico JEOL JEM1010 (Jeol Ltd., Tokio, Japón) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Trasmisión del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM. Para el análisis ultraestructural de miotubos en cultivo, los mioblastos se sembraron y diferenciaron sobre portaobjetos de plástico Permanox de cultivo celular con cámara (Lab-Tek) y posteriormente se fijaron e incluyeron como se ha descrito anteriormente, excepto que no se añadió acetona en los pasos de deshidratación. Los miotubos se incluyeron en resina Epon, se seccionaron y se contratiñeron como se ha indicado para el tejido muscular.

Inmunomarcaje post embedding con partículas de oro (Inmunogold)

La inmunotinción con oro se realizó en muestras de gastrocnemio de ratones de la línea delACAG fijadas en 0,25% glutaraldehído/4% PFA en tampón fosfato 0,1M, deshidratado e incluido en resina LR White. A continuación, se realizaron secciones ultrafinas de 60 nm recogidas en rejillas de níquel de malla 200 mesh, las cuales se bloquearon e incubaron con anti-FXR1P (Proteintech; 1:100) y el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con partículas de oro de 10 nm (Aurion; 1:30) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Aurion). Las muestras se fijaron posteriormente en glutaraldehído al 2% en PBS y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en agua. El examen de las muestras y adquisición de fotografías se realizó con un microscopio electrónico JEOL JEM1010 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Aislamiento de fibras musculares a partir del músculo EDL e inmunofluorescencia

Para este procedimiento se diseccionaron los músculos extensor largo de los dedos (EDL) de ambas extremidades y se digirieron con colagenasa tipo I (Sigma) al 2% en DMEM durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se transfirieron a placas de Petri de 60 mm de diámetro pre-recubiertas con HS, las

cuales contenían DMEM + 1% de P/S. Para liberar las miofibras se realizó un pipeteo suave de medio sobre el tejido, según lo descrito por Pasut, Jones, and Rudnicki 2013. Para los experimentos de inmunofluorescencia, las fibras de EDL aisladas se colocaron en portaobjetos de vidrio de cultivo celular con cámara (Lab-Tek), pre-recubiertos previamente con 3% de matrigel, y se incubaron en DMEM + 2% HS + 1% P / S durante 2 h antes de ser fijadas durante 5 min a temperatura ambiente en 4% PFA precalentado a 37°C. Las fibras se permeabilizaron en 0,5% Triton X-100/PBS durante 10 min, se bloquearon en 4% suero/0,1% Triton X-100/PBS durante 30 min y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo O/N a 4°C. Después de varios lavados con 0,1% Triton X-100/PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes (Molecular Probes) y/o Alexa Fluor 546-faloidina (Molecular Probes A22283, 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:1.000 en PBS), o yoduro de propidio (Sigma-Aldrich; 20 µg ml en 0,05% Tween-PBS). Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje antidecoloración ProLong™ Diamond (Molecular Probes).

Mioblastos y miotubos diferenciados tanto de ratón como humanos, y células HeLa se cultivaron sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos. Tras el tiempo necesario de incubación, se lavaron 2 veces en PBS, se fijaron en 4% PFA/PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100/PBS durante 15 minutos y se bloquearon en 4% de suero/0,05% de Triton X-100/PBS por 30 min. Seguidamente, las células se incubaron con anticuerpo primario O/N a 4°C, se lavaron 3 veces con 0,05% Tween/ PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (Molecular Probes) durante 1 hora. Tras los lavados correspondientes, los núcleos se tiñeron con DAPI antes de montar las muestras con ProLong™ Diamond (Molecular Probes).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: FXR1P (Proteintech 13194-1-AP, 1: 200), α -actinina (Millipore 05-384, 1: 200), RYR (Abcam ab2868, 1: 200), COX-IV (Invitrogen 459600, 1: 200), desmina (Abcam ab6322, 1: 100), MHC (R&D MAB4470, 1: 2.000), TIAR (Santa Cruz sc-1749, 1:30), FXR2P (Santa Cruz sc-32266 1:60), FMR1P (DSHB 7G1-1, 1:70), RCK (Santa Cruz sc-376433, 1:30).

Hibridación *in situ* fluorescente de ARN

Las fibras de EDL de ratón aisladas como se ha descrito previamente, se colocaron en portaobjetos de vidrio de cultivo celular con cámara (Lab-Tek), pre-recubiertos previamente con 3% de matrigel, y se incubaron en DMEM + 2% HS + 1% P / S durante 2 h antes de ser fijadas en 4% PFA durante 10 min y se permeabilizadas en 0,5% Triton X-100/PBS 30 min. Posteriormente, las fibras se incubaron en tampón de prehibridación (30% formamida/2xSSC) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se hibridaron durante 2 horas a 37°C con 1 ng·µl⁻¹ de sonda de oligonucleótidos marcada con Cy3 en tampón de hibridación (30% formamida, 10% sulfato de dextrano, 1 mg·ml⁻¹ de ARNt de levadura, 2xSSC, 2 mM complejo de vanadilo, 0,005% BSA). La detección de ARNm con cola poli-A se llevó a cabo con oligo-(dT)₃₀ marcado con Cy3 en el extremo 5'

y como control negativo se utilizó una sonda oligonucleotídica previamente publicada (Soares et al., 2018) también marcada con Cy3 en el extremo 5', cuya secuencia (5'-TGTAACACGTCTATACGCCCA-3') estaba determinada al azar (scramble). Después de la hibridación, las fibras se lavaron en 30% formamida/4xSSC durante 20 min, 4xSSC 20 min y 2xSSC 20 min antes del inmunomarcaje. El anticuerpo anti-FXR1P (Proteintech 1:200) y anticuerpo secundario (Molecular Probes, 1:1.000) se diluyeron en 0,1% Triton X-100/2xSSC y los lavados posteriores se realizaron en 2xSSC. Las fibras fueron contrateñidas con DAPI, montadas con ProLong™ Diamond (Molecular Probes) y evaluadas por microscopía confocal en un microscopio confocal Leica SP5 o Zeiss LSM710. El mismo procedimiento se aplicó para miotubos humanos diferenciados en cultivo.

Mutagénesis dirigida, plásmidos y transfecciones

Para la obtención de vectores de transfección portadores de las distintas iso-e de *FXR1*, inicialmente se utilizó como molde ARNm de músculo humano suministrado por Clontech, a partir del cual se sintetizó ADNc con random primers y SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher), siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, la iso-e de *FXR1* wild type (wt) fue amplificada mediante PCR utilizando la enzima Platinum SuperFi ADN polimerasa (Invitrogen, ThermoFisher), clonada en el vector bacteriano pBluescript SK (+) y la secuencia verificada por secuenciación Sanger. Este plásmido conteniendo el ADNc wt de la iso-e de *FXR1* (XM_005247813.3) se utilizó como molde para crear, con la ayuda de kit de mutagénesis QuikChange II XL (Agilent Technologies), las variantes de iso-e portadoras de las mutaciones delACAG, delA y dupA. Las distintas variantes de iso-e mutantes y wt fueron insertadas posteriormente en el plásmido pEGFP-C1 (Clontech) para obtener las proteínas de fusión EGFP::FXR1P correspondientes. Todas las construcciones fueron validadas por secuenciación Sanger.

En los experimentos de transfección de células HeLa se sembraron 50.000 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos y tras 24 horas se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Invitrogen) usando 500 ng de ADN plasmídico por pocillo en medio OptiMEM (Gibco). Después de 5-7 horas, el medio de transfección fue reemplazado por medio de crecimiento. Las células HEK293T se sembraron en placas Petri p100 y 24 horas después se transfectaron mediante el método estándar de fosfato de calcio con cloroquina. Tras 16 horas, el medio de transfección se reemplazó por medio de crecimiento y 48 horas más tarde, se realizó la extracción proteica para corroborar la correcta expresión de las proteínas de fusión EGFP::FXR1-iso-e por WB.

Inducción de gránulos de estrés y agresomas

Para la inducción de gránulos de estrés (SG), mioblastos sembrados sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (100.000 células/pocillo) y mantenidos durante 24 horas en medio de diferenciación,

o células HeLa previamente transfectadas, se incubaron en 0,5 mM de arsenito (ARS, Sigma) diluido en el medio de cultivo celular correspondiente, durante 45 minutos a 37°C/5% de CO₂ antes de la fijación. Para las células HeLa, el medio de cultivo se refrescó 1 hora antes de la incubación con ARS.

En el caso de los experimentos de inducción de agresomas, los cultivos primarios de mioblastos humanos control y V-4, se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (100.000 células/pocillo), se mantuvieron durante 24 horas en medio de diferenciación, y se incubaron con inhibidor de proteasoma (MG-132, PROTEOSTAT® Aggresome Detection reagent (Enzo Life Sciences)) a una concentración final de 10 µM en medio de diferenciación de miotubos durante 6 horas a 37°C/5% de CO₂. Posteriormente, los mioblastos se fijaron con 4% PFA/PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100/3mM EDTA pH8/1% buffer de ensayo (PROTEOSTAT® Aggresome Detection reagent kit (ENZ-51035, Enzo Life Sciences)) durante 30 minutos y se bloquearon en 4% de suero/0,05% de Tween-20/PBS por 30 min. Las células se incubaron con anticuerpo primario anti-FXR1 (Proteintech 13194-1-AP, 1: 200) O/N a 4°C, se lavaron 3 veces con 0,05% Tween/PBS y se incubaron con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) durante 1 hora. Tras los subsecuentes lavados con 0,05% Tween/PBS, se tiñeron con PROTEOSTAT® Aggresome Detection reagent (Enzo Life Sciences, 1:500) y Hoechst 33342 (Enzo Life Sciences, 1:1.000) durante 30 min, antes de lavar dos veces con PBS y montar los cubreobjetos con ProLong™ Diamond (Molecular Probes).

Cuantificación de fluorescencia en agresomas

Para la cuantificación de fluorescencia en los experimentos de inducción de agresomas en células tratadas con MG132, por cada línea celular, se adquirieron un mínimo de tres imágenes en cada replica experimental en un microscopio confocal Zeiss LSM710. La fluorescencia fue cuantificada a partir de la proyección máxima de todos los planos en células individuales con ayuda del software Image J, en las células tratadas con MG-132. Las células analizadas fueron delimitadas con un ROI y se determinó el valor del parámetro “integrated density” para la tinción con agresomas en cada célula. Se delimitó un threshold para no incluir las áreas sin fluorescencia en la medida. Este threshold se mantuvo constante en todas las réplicas experimentales en ambas líneas celulares.

Análisis de transcriptoma mediante RNAseq

Para el RNAseq se usaron muestras de ARN correspondientes a 3 ratones wt y 3 homocigotos para la mutación delACAG. Las muestras de ARN se aislaron de gastrocnemio y sóleo de ratones P15 usando una solución TriReagent (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuenciación de ARN y procesado bioinformático fueron encargados a Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). El análisis de expresión diferencial entre las muestras wt y delACAG se realizó utilizando paquetes estadísticos diseñados

por Python y R. Los niveles de expresión se calcularon usando el HTSeq (Anders et al., 2015) y el análisis de expresión diferencial entre las condiciones se evaluó usando DESeq2 (Love et al., 2014) aplicando una distribución binomial negativa para la significación estadística (Benjamini et al., 2001). Posteriormente se seleccionaron genes expresados diferencialmente (DEG) con un valor P-ajustado por FDR $\leq 0,05$ (Benjamini et al., 2001) y una variación inferior de -1,9 o superior a 1,9 para descartar la inclusión de falsos positivos en los datos de expresión diferencial. Para el análisis de enriquecimiento funcional se procesaron conjuntos de genes expresados diferencialmente usando ClusterProfiler (Yu et al., 2012) y se buscaron los procesos biológicos involucrados en dichos conjuntos utilizando un paquete de Bioconductor. Esta herramienta busca genes en bases de datos específicas (Ontología génica (GO), Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG)) para evaluar las anotaciones biológicas que se encuentran sobrerrepresentadas con respecto al genoma completo.

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para los experimentos de RT-qPCR en ratones, se diseccionó el gastrocnemio de ratones wt y mutantes de la misma edad y se mantuvo congelado a -80°C en RNAlater (Ambion) hasta su procesamiento. Para el análisis de los niveles de expresión de *Fxr1* se usaron muestras de músculo de ratones de 2,5 meses de edad, y para el resto de los genes se obtuvo ARN de ratones de 1,5 meses de edad. El tejido se homogeneizó con un ULTRA-Turrax T10 básico (IKA), y el ARN se extrajo utilizando la solución TriReagent de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 250 ng de ARN total con el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) usando cebadores aleatorios en el Servicio de Genómica del IIBM. La RT-qPCR se realizó en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con sondas TaqMan (Applied Biosystems). Para cada ensayo TaqMan se analizaron tres ratones por genotipo. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron frente a los de genes constitutivos (*Tbp*, *Gusb*). Las diferencias de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ utilizando como muestra calibradora el valor medio de ΔCt de los ratones wt.

Se utilizaron los siguientes ensayos: *Fxr1* (exones 2-3; Mm00484523_m1), *Fxr1* (exones 14-15; Mm01286304_m1), *Trp53* (exones 1-2; Mm01731287_m1), *Trp53* (exones 9-10 Mm01337166_mH), *Trp63* (Mm00495788_m1), *Trp73* (Mm00660220_m1), *4930567H12Rik* (*Cdkn1a*, Mm00432448_m1), *Rb1* (Mm01310562_m1), *Nfkb2* (Mm00479807_m1), *Eda2r* (Mm01236761_m1), *Tnfrsf22* (Mm00445826_m1), *Tnfrsf23* (Mm00656375_m1), *Bex1* (Mm00784371_s1), *Cxcl10* (Mm00445235_m1), *Wdr35* (Mm00552654_m1), *Ankrd1* (Mm00496512_m1), *Gdf15* (Mm00442228_m1), *Myh3* (Mm01332463_m1), *Sln* (Mm00481536_m1), *Terc* (Mm01261365_s1), *Nos1* (Mm01208059_m1), *Mstn* (Mm01254559_m1), *Tbp* (Mm00446973_m1), *Gusb* (Mm01197698_m1). Para los ensayos TaqMan capaces de detectar ADN genómico (*Cdkn1a*, *Bex1* and *Terc*), el ARN se trató con Turbo-DNA-free Kit (ThermoFisher) para eliminar la posible contaminación residual de ADN.

En los experimentos de RT-qPCR realizados con fibroblastos primarios humanos, el aislamiento de ARN total se realizó a partir de placas p60 en confluencia utilizando la solución TriReagent. Se extrajo ARN de 3 p60 diferentes de cada línea celular, y cada muestra se procesó por triplicado. La síntesis de ADNc y la RT-qPCR se llevó a cabo del mismo modo que en el caso del músculo esquelético de ratones. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron frente a los de genes constitutivos *GUSB* o *GAPDH*. Las diferencias de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando como muestra calibradora el valor medio de ΔC_t de los fibroblastos control C1. Las sondas TaqMan utilizadas fueron *MAPKAPK5* (Hs00177572_m1 y Hs00934300_m1), *GUSB* (Hs99999908_m1) y *GAPDH* (Hs99999905_m1).

Ensayo de remodelación del citoesqueleto de filamentos de actina (F-actina)

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kosmas et al. 2015. Brevemente, se sembraron fibroblastos sobre cubreobjetos de cristal en una placa de 24 pocillos, a una confluencia de $2 \cdot 10^4$ células por pocillo en medio de crecimiento. Al día siguiente, las células se incubaron durante 30 minutos en DMEM con 2,5 μ M de Latrunculina-B (Abcam, Cambridge, UK, ab144291), previamente disuelta en DMSO. Después de los 30 minutos, se eliminó el medio, las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar cualquier traza de Latrunculina-B, y se incubaron con medio de crecimiento durante distintos tiempos de recuperación a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células se fijaron 10 minutos con 4% PFA/PBS, se permeabilizaron en 0,1% Triton X-100/PBS 10 minutos y se tiñeron durante 30 minutos con Alexa Fluor 546-faloidina (1:200) y DAPI (1:1.000) en 0,05% Tween/PBS para visualizar los filamentos de F-actina y los núcleos, respectivamente. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Nikon 90i.

Cuantificación por citofluorescencia de la proporción F-actina/G-actina

Para la evaluación por citofluorescencia de la proporción de actina filamentosa (F-actina)/actina globular monomérica (G-actina) en fibroblastos, estas células se sembraron sobre cubreobjetos en medio de crecimiento a una densidad de $3,5 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron con Latrunculina-B/DMSO (2,5 μ M) o DMSO como se describe en el apartado anterior. A continuación, los fibroblastos se lavaron con PBS y se fijaron en 4%PFA/PBS, o se cultivaron en medio completo durante 30 minutos antes de su fijación. En cada réplica técnica, se incluyó un control de células sin tratamiento las cuales fueron sembradas simultáneamente a la misma densidad, mantenidas en DMEM durante 30 minutos, lavadas con PBS y cultivadas durante otros 30 minutos en medio de crecimiento antes de ser fijadas. Los fibroblastos se fijaron y permeabilizaron como en el apartado anterior, y se tiñeron con Alexa Fluor 488-faloidina (1:500, Molecular probes A12379), Alexa Fluor 594-Desoxirribonucleasa I (DNasa I; 1:500, Molecular Probes D12372) y DAPI durante 30 min para marcar los filamentos de actina (F-actina), los monómeros globulares de actina (G-actina) y los núcleos, respectivamente. Por cada línea celular, se

adquirieron tres imágenes por condición en cada replica experimental en un microscopio confocal Zeiss LSM710. La citofluorescencia fue cuantificada del mismo modo que para la tinción de agrosomas descrito en el apartado anterior. En este caso, se determinó el valor del parámetro “integrated density” para faloidina y DNasa I en cada célula. Se delimitó un threshold en cada uno de los canales de fluorescencia para no incluir las áreas sin fluorescencia en la medida. Este threshold se mantuvo constante dentro de cada replica experimental en todas las líneas celulares y condiciones.

Imagen, análisis estadísticos y bases de datos

Todos los análisis y cuantificaciones de imágenes, así como la densitometría de los WB, se realizaron con la ayuda del software Image J-Fiji. Para la predicción de fosforilación, las secuencias de iso-e humana wt y mutadas (delACAG, delA y dupA) a partir del primer aminoácido del exón 15 fueron analizadas con el software NETphos 3.1 predictor (N Blom et al., 1999; Nikolaj Blom et al., 2004).

El análisis de segregación mendeliana de la descendencia en los cruces entre heterocigotos de las líneas de ratones CRISPR se realizó utilizando un test de χ^2 de contingencia con 2 grados de libertad y $p=0,05$.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software GraphPad Prism 6.0. Se utilizaron las pruebas de normalidad D’Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov o el valor de las variables skewness & kurtosis para evaluar la distribución normal de los datos. El *F*-test de varianza y los test de Barlett o de Brown-Forsythe se usaron para evaluar la homocedasticidad de los datos. Las pruebas paramétricas que incluyen ANOVA de una vía con un Tukey post-test o el *t*-test de Student no pareado de dos colas se utilizaron cuando la normalidad y homocedasticidad de los datos lo permitieron. Cuando esto no fue así, se usaron los tests no paramétricos Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn como post hoc, un *t*-test de Student con corrección de Welch o un test Mann-Whitney de dos colas. No se utilizó aleatorización, predeterminación del tamaño de la muestra o doble ciego. Los valores de $P \geq 0,05$ se consideraron estadísticamente no significativos, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Las bases de datos utilizadas para los estudios génicos fueron:

- dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- ExAC (Exome Aggregation Consortium): <http://exac.broadinstitute.org/>
- ESP (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA): <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
- 1000 G (1000 Genomes Project): <http://www.internationalgenome.org/home>
- gnomAD (Genome Aggregation Database): <http://gnomad.broadinstitute.org/> (Karczewski et al., 2020)

- Kaviar (~Known VARiants): <http://db.systemsbiology.net/kaviar/>



RESULTADOS

Capítulo 1: Caracterización de un nuevo tipo de miopatía congénita causada por mutaciones en el gen *FXR1*

Evaluación clínica

La evaluación clínica de la familia 1, que se describe a continuación, fue realizada por el equipo de las Profesoras Maha Zaki, Mona Aglan, Samia Temtamy y la Dra. Ghada A. Otafy en el Centro de Excelencia para la Genética Humana, El Cairo, Egipto.

El probando de la familia 1 era un paciente masculino egipcio de dos meses y medio de edad, nacido de padres sanos consanguíneos (primos hermanos). Los antecedentes familiares incluían una hermana con afectación similar, fallecida a la edad de 70 días y un aborto espontáneo previo (Fig. 11a). Dicha hermana nació por cesárea, habiéndose detectado oligohidramnios y disminución del movimiento fetal durante el embarazo. Al nacer la bebé fue ingresada en la unidad de cuidados intensivos neonatales durante 21 días debido a dificultades respiratorias. Entre los síntomas clínicos se encontraron: fracturas recurrentes del húmero y fémur, cuello corto, hipotonía grave, hiperlaxitud de las articulaciones y desviación cubital de las manos. Los análisis clínicos determinaron niveles normales de calcio, fósforo, fosfatasa alcalina y una función hepática y renal sin alteraciones. La ecografía abdominal fue normal, y la ecocardiografía mostró un pequeño defecto del tabique auricular. El cariotipo era 46, XX. El probando también nació por cesárea a término del embarazo. Durante la gestación, se observó movimiento fetal reducido y disminución del líquido amniótico. Tras el nacimiento, el paciente fue ingresado en la unidad de cuidados intensivos neonatales durante un mes, debido a hipotonía grave y fracturas múltiples de huesos largos con episodios de taquicardia que requirieron propranolol. En el examen pediátrico a los dos meses y medio de edad, se observó que el niño estaba alerta con buen contacto visual y seguía objetos adecuadamente. No obstante, se encontraba hipotónico, presentaba arreflexia, tenía fasciculaciones de la lengua, llanto muy débil, respiración superficial y necesitó un tubo de Ryle para ser alimentado debido a una función oromotora débil. Las medidas antropomórficas a los dos meses y medio de edad fueron: circunferencia de la cabeza 39 cm (percentil 50), peso de 4,9 kg (percentil 50) y una longitud de 55 cm (-0,5 SD). El bebé tenía un cuello corto y deformidades esqueléticas. Las manos presentaban desviación cubital y dedos hiperextendidos. Los pies se encontraban desviados lateralmente con flexión dorsal y los fémures arqueados debido a una incorrecta unión después de la fractura. Los genitales eran hipoplásicos y la ecografía abdominal identificó criptorquidia. El estudio esquelético mediante rayos X mostró fracturas en húmero y fémur con formación normal de callos de fractura (Fig. 11b-c).

Desde el punto de vista neurológico, la electromiografía mostró una fuerza motora de grado 1 (ausencia completa de movimiento). En cambio, la tomografía computarizada (TC) del cerebro y la ecocardiografía fueron normales. El bebé falleció a la edad de cinco meses. Posteriormente, se produjo una interrupción

médica de un nuevo embarazo debido a la falta de movimiento fetal que sugería la misma patología, lo cual fue confirmado clínicamente posteriormente.

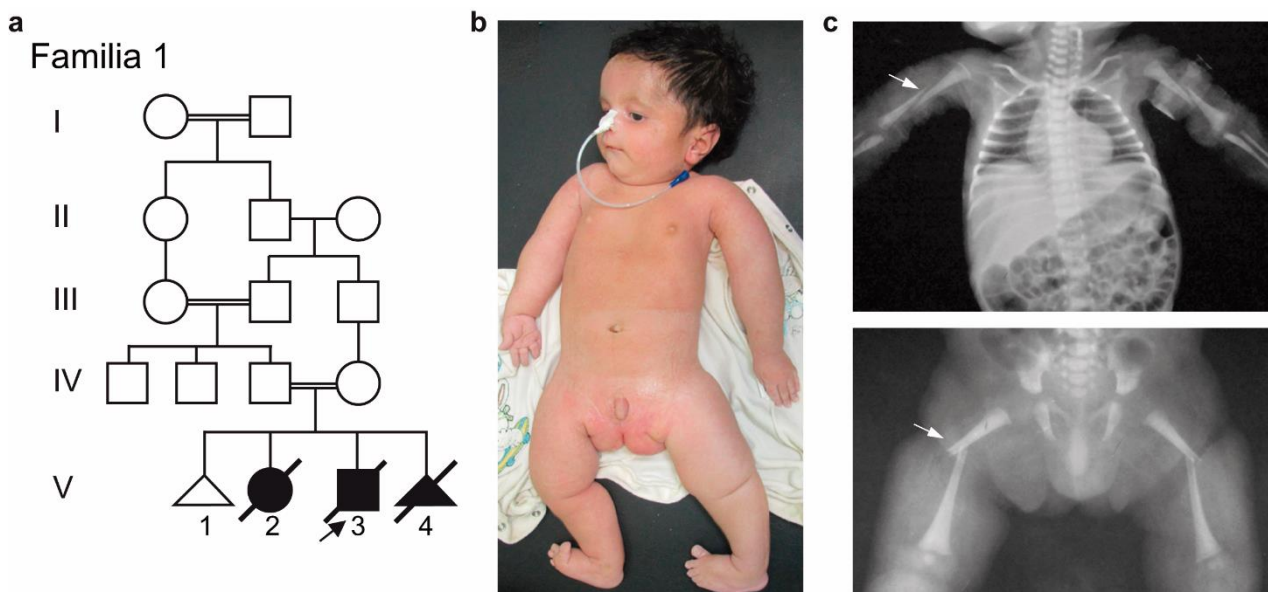


Figura 11: Pedigrí y características clínicas de la familia 1. a) Pedigrí de la familia 1 en el que se muestra el probando (flecha), hermana mayor afectada y feto afectado. b) Imagen clínica correspondiente al probando de la familia 1 a la edad de 2,5 meses observándose cuello corto, manos y dígitos cortos, rotación de las extremidades superiores e inferiores debido a hipotonía grave. La imagen también muestra pulgares bilaterales de inserción baja con flexión dorsal de ambos pies e hipoplasia genital. c) Radiografías del probando (vista antero-posterior) demostrando fracturas bilaterales en la región central de húmeros (panel superior, flecha) y fémures (panel inferior, flecha).

Identificación de mutaciones recesivas en el exón 15 exclusivo de músculo de *FXR1* en pacientes con miopatía congénita

Para determinar la causa genética subyacente en la familia 1, y teniendo en cuenta la consanguinidad parental, se realizó un mapeo de homocigosidad mediante hibridación en arrays de SNPs en combinación con secuenciación WES en el probando de esta familia (V-3, pedigrí familia 1, Fig. 11a). Las variantes WES se filtraron por frecuencia alélica y funcionalidad, según se indica en la tabla 3, de acuerdo a un modelo de herencia recesiva tomando como hipótesis que la mutación era homocigota por descendencia. En base esta premisa, se priorizaron variantes situadas en regiones cromosómicas de homocigosidad (ROH) establecidas por los arrays y se identificó una delección de cuatro nucleótidos en el extremo 3' del exón 15 alternativo de *FXR1* (XM_005247813.3:c.1764_1767delACAG (en adelante denominada como delACAG)), como principal candidata debido a la conocida participación de este gen en el desarrollo muscular (tabla 4). La variante delACAG estaba ausente de las bases de datos de variación genética en humanos (gnomAD, ExaC, EVS y 1000 GP) y se confirmó por secuenciación Sanger que se encontraba en homocigosis en el probando

y en el feto afectado (V-4), mientras que ambos padres fueron verificados como portadores de la mutación en heterocigosis (Fig. 12a). No se disponía de ADN de la hermana anterior. Posteriormente, se realizó un estudio de homocigosidad en V-4 y, como se espera en los casos de consanguinidad, el resultado de la hibridación en arrays de SNPs mostró la mutación identificada en *FXR1* embebida dentro de una amplia ROH en V-4, al igual que en el probando (54,6 MB en el probando y 23,7 MB en V-4) (Fig. 12c).

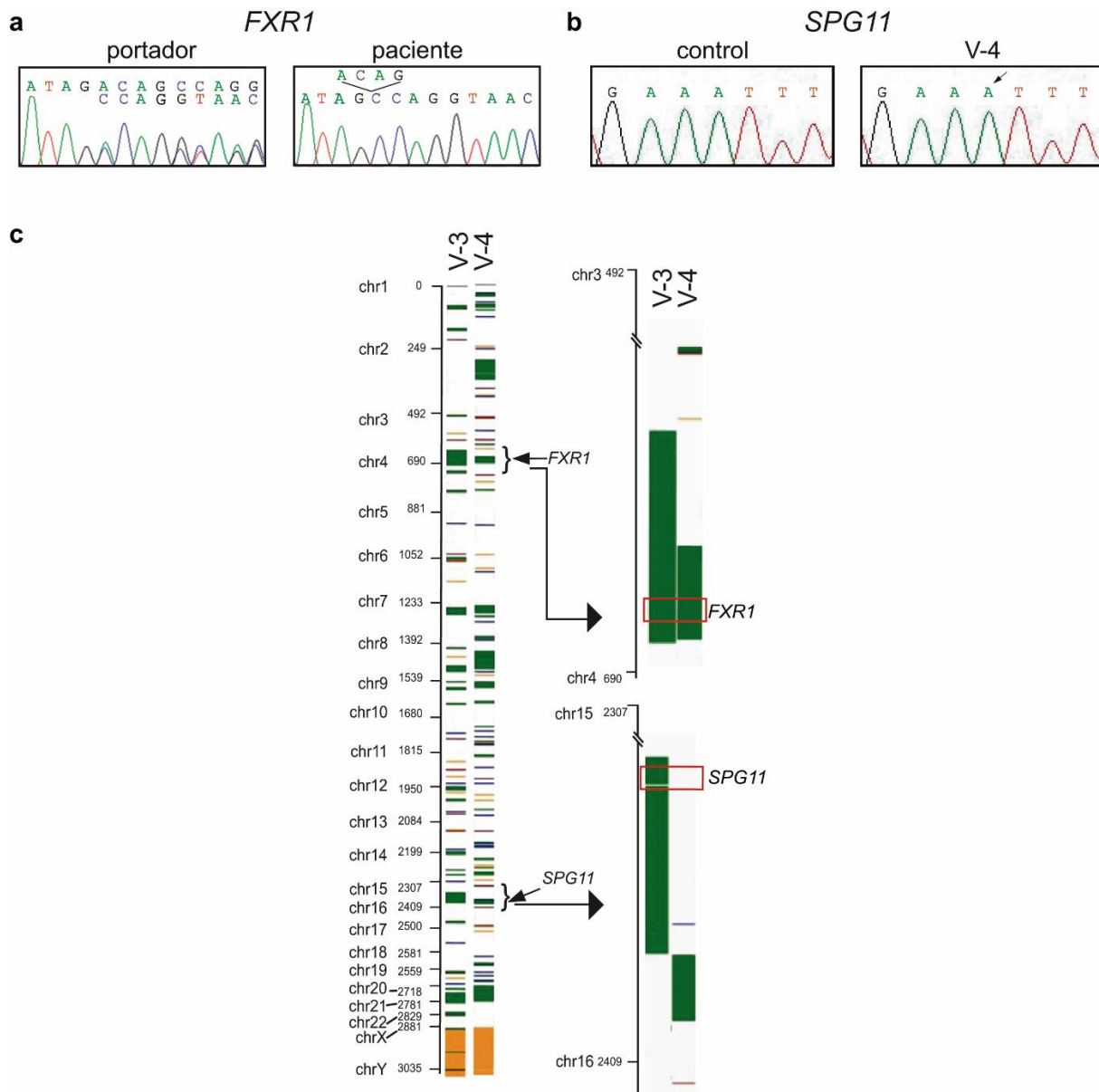


Figura 12: Estudio genético de la familia 1. a) Los cromatogramas muestran una delección homocigota de 4 nucleótidos en el extremo 3' del exón 15 de *FXR1* en el probando, la cual se encuentra en heterocigosis en los padres (portadores). b) Cromatogramas correspondientes a la secuenciación de un fragmento del exón 39 del gen *SPG11* a partir de ADNc proveniente de fibroblastos primarios control o del feto afectado (V-4). El cambio ocurrido en dicho gen en el probando (marcado como una flecha) no está presente en el feto afectado y fue descartado como causa de la enfermedad. c) Resultado de hibridación en arrays de SNPs en el probando (V-3) y en V-4 que muestra *FXR1* dentro de una gran ROH (cajas verdes) en V-3 (54,6 MB) y V-4 (23,7 MB) en el cromosoma 3. El gen *SPG11* (cromosoma 15) no se encuentra dentro de una ROH en V-4. La imagen se obtuvo con el software GenomeStudio (Illumina).

A nivel de proteína, teniendo en cuenta las dos isoformas de la proteína FXR1P que incluyen el exón 15 alternativo (P82-84, iso-e/f), el desplazamiento en el marco de lectura originado por la delección de cuatro nucleótidos (delACAG), predictivamente reemplazaría los últimos 90 aminoácidos de estas proteínas por 36 residuos nuevos (p.Arg588Serfs*37), originando un codón de terminación de la traducción prematuro (PTC). La regla de la degradación del ARNm mediada por mutación terminadora (NMD), indica que un codón de terminación prematuro (PTC), es reconocido como tal y, por tanto, el ARNm de ese transcrito es degradado, cuando la distancia entre éste y la unión exón-exón más cercana en dirección 3' es mayor de 50-55 nucleótidos (Nagy & Maquat, 1998). Según este criterio, debido a que el PTC que se genera por la delección de 4 nucleótidos en esta familia se encuentra en el último exón del gen, los transcritos mutantes correspondientes deberían escapar de la NMD (Fig. 13).

En relación a otros posibles genes candidatos, el análisis de WES del probando reveló un cambio homocigoto sin sentido en el gen de paraplejia espástica *SPG11* (p.I2350V; frecuencia alélica (AF) gnomAD: 2.438e-5). Este cambio fue clasificado como benigno por los programas informáticos de predicción de patogenicidad (tabla 4). No obstante, mediante secuenciación Sanger, se demostró la ausencia de esta variante en V-4 por lo que se descartó como la causa de la enfermedad (Fig. 12b). Asimismo, teniendo en cuenta el fenotipo artrogripótico del probando, la Dra. Concepción Hernández-Chico, del Servicio de Genética del Hospital Ramón y Cajal, realizó un estudio de los genes *SMN1/2* por MLPA en el probando, dado que las delecciones de ADN que involucran este locus son la causa más frecuente de atrofia muscular espinal (Naldaiz-Gastesi et al., 2016). Se identificaron tres copias de *SMN2* y dos copias de *SMN1* excluyendo alteraciones en este locus como causa de la patología en el probando. Finalmente, en la tabla 5 se indican variantes de genes implicados en miopatías multi-minicore con frecuencias inferiores a 0,1 identificados por WES en la familia 1, que podrían actuar como modificadores genéticos potenciales. Estas variantes no fueron consideradas como candidatas de causar la enfermedad debido a que, o no estaban presentes en todos los miembros afectados de la familia, o estaban caracterizadas como variantes benignas en la base de datos ClinVar de NCBI.

Durante el desarrollo de esta tesis, y a través de la plataforma GeneMatcher, se inició una colaboración con la Dra. Grace Yoon (The Hospital for Sick Children, Universidad de Toronto, Canadá), quien había realizado WES en 3 hermanos adultos (familia 2) diagnosticados con debilidad muscular, y había obtenido como resultado una delección homocigótica de un solo nucleótido, también en el exón 15 alternativo de *FXR1* (XM_005247813.3:c.1707delA; p.Lys569Asnfs*57 (en adelante denominada como delA)) (Estañ et al., 2019). La delección c.1707delA provoca un cambio hacia el mismo marco de lectura que la variante c1764_1767delACAG de la familia 1. Sin embargo, el cambio c.1707delA se encuentra en el extremo 5' del exón 15 y, por tanto, las isoformas P82-84 predichas como consecuencia de la mutación delA, carecen de la mayoría de los aminoácidos específicos del exón 15 alternativo (Fig. 13). Aunque los padres de la familia no estaban relacionados, se realizó una hibridación en arrays de SNPs, que demostró que los tres hermanos afectados eran homocigotos en una región de 5,98 MB que comprendía el gen *FXR1*. Teniendo en cuenta la

heterogocidad materna para la variante, demostrada por el equipo de la Dra. Grace Yoon a través de secuenciación Sanger (Estañ et al., 2019), y la falta de material genético del padre para su análisis, se estudió la hipótesis de que esta región estuviese delecionada en el alelo paterno. Esta hipótesis fue descartada después de la evaluación del número de copias alélicas a través del parámetro log-R del array de SNPs y por aCGH en los tres hermanos afectados (Fig. 14a-b).

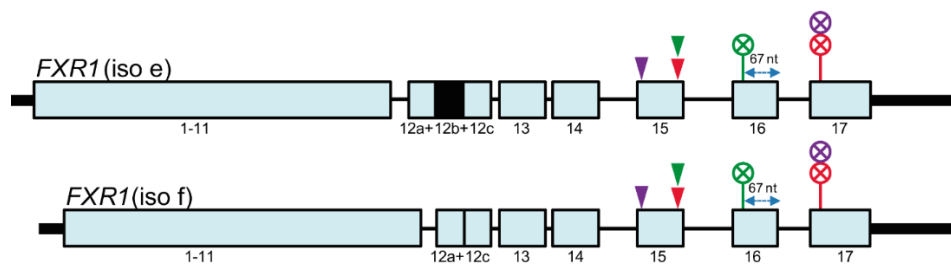


Figura 13. Representación esquemática de las isoformas musculares de *FXR1* y localización de las mutaciones del exón 15 en humanos y ratón. Representación esquemática de los exones 12-15 (cajas independientes) de las iso-e/f de *FXR1* que codifican las proteínas de 82 y 84 KDa. La parte central del exón 12 (caja negra: 12b) presenta un splicing alternativo y no se encuentra en la iso-f. Los cambios en el marco de lectura dentro del exón 15 que provocan las variantes de este estudio están indicados con una cabeza de flecha de color morado (delA), rojo (delACAG) y el correspondiente codón de terminación prematuro (PTC) generado por estas mutaciones se muestra como una cruz rodeada de idéntico color. Las variantes delA y delACAG comparten el mismo PTC en el extremo 5' del exón 17 final. En verde se muestra la variante dupA y su correspondiente PTC correspondiente a ratones CRISPR con mutación en el exón 15 de *Fxr1* que se describen más adelante. El PTC de la variante dupA se localiza 67 nucleótidos (nt) aguas arriba de la última unión exón-exón, por lo que estaría sometido a degradación del ARNm mediada por mutación terminadora (NMD).

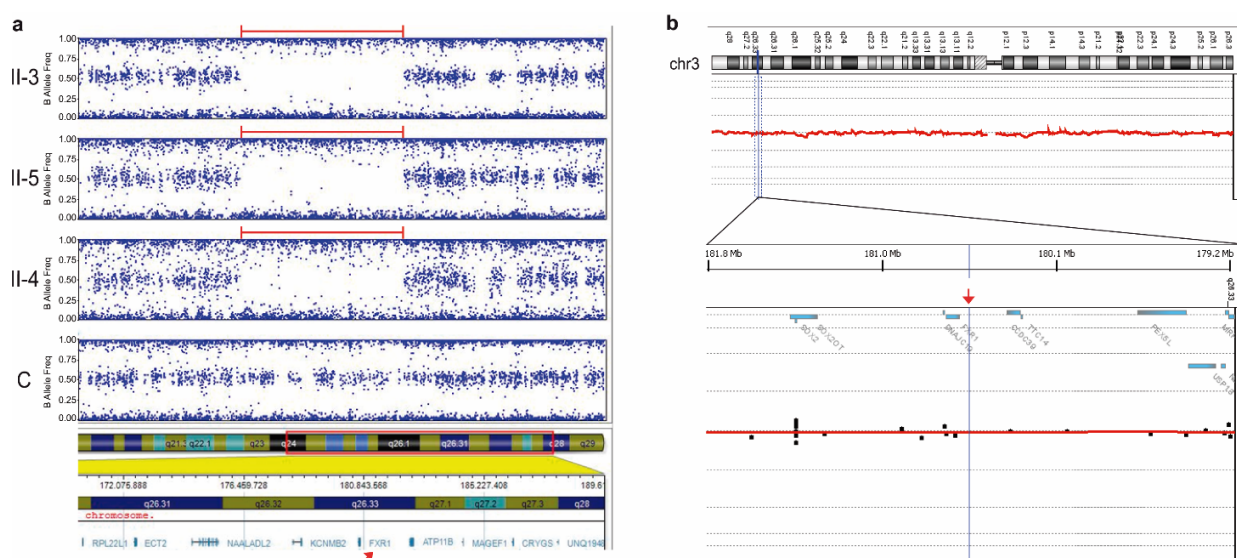


Figura 14. Estudio de hibridación genómica en array SNPs y aCGH. a) BAF (Frecuencia alelo B) correspondiente a la hibridación de ADN genómico de los tres hermanos afectados de la familia 2 y un individuo control (C) en un array SNPs de genoma completo que revela una ROH de 5,98 MB en el cromosoma 3 (líneas rojas) en los tres pacientes en la cual se encuentra *FXR1* (flecha roja). Los gráficos del BAF corresponden a un fragmento del cromosoma 3 que abarca desde q26.31 hasta q28. La imagen se obtuvo con el software GenomeStudio (Illumina). b) aCGH (60.000 sondas) para el cromosoma 3 correspondiente a uno de los hermanos afectados de la familia 2 donde se observa que no hay deleción heterocigota en la región que abarca *FXR1*. Las imágenes se obtuvieron con el software Workbench Standard Edition 5.0 (Agilent Technologies).

Las isoformas musculares de FXR1P con la mutación delACAG tienen diferente solubilidad y se localizan en gránulos citoplasmáticos

Para determinar el efecto de la mutación delACAG en las isoformas de FXR1P, se aislaron mioblastos primarios a partir de una biopsia muscular del individuo V-4 de la familia 1, y se estudió la expresión de FXR1P en estas células, antes y después de la diferenciación en miotubos. El análisis de WB demostró que las células V-4 sintetizan todas las isoformas de FXR1P cuando están sin diferenciar en el estadio de mioblasto. Sin embargo, comparado con células control, las iso-e/f de V4 presentaban menor peso molecular, acorde con la consecuencia prevista por la mutación, y se detectaron predominantemente en la fracción no soluble (IF) de los lisados proteicos de mioblastos, y de modo mucho más evidente en los de miotubos, ya que este último tipo celular se caracteriza por expresar exclusivamente las iso-e/f de FXR1P y en mayor proporción que mioblastos (Khandjian, 1998) (Fig. 15a).

Por otro lado, se realizó un estudio de inmunofluorescencia contra la proteína FXR1P. Este análisis demostró que, mientras que en miotubos diferenciados control las isoformas P82-84 estaban distribuidas de forma homogénea por todo el citoplasma, en los miotubos diferenciados de V-4 se localizaban en gránulos citoplasmáticos en forma de anillo. En cambio, cuando el mismo análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo en mioblastos, se encontró que las isoformas de FXR1P estaban distribuidas de forma similar en el citosol de mioblastos control y de V-4, excepto por la presencia de unos pocos gránulos en una pequeña fracción de mioblastos de V-4 (Fig. 15b).

El análisis por WB de la expresión de las isoformas de FXR1P en fibroblastos, que son células que no expresan las iso-e/f exclusivas de músculo, no reveló ninguna diferencia entre paciente V-4 y control indicando que la mutación delACAG sólo afecta a la expresión de las iso-e/f (Fig. 15c).

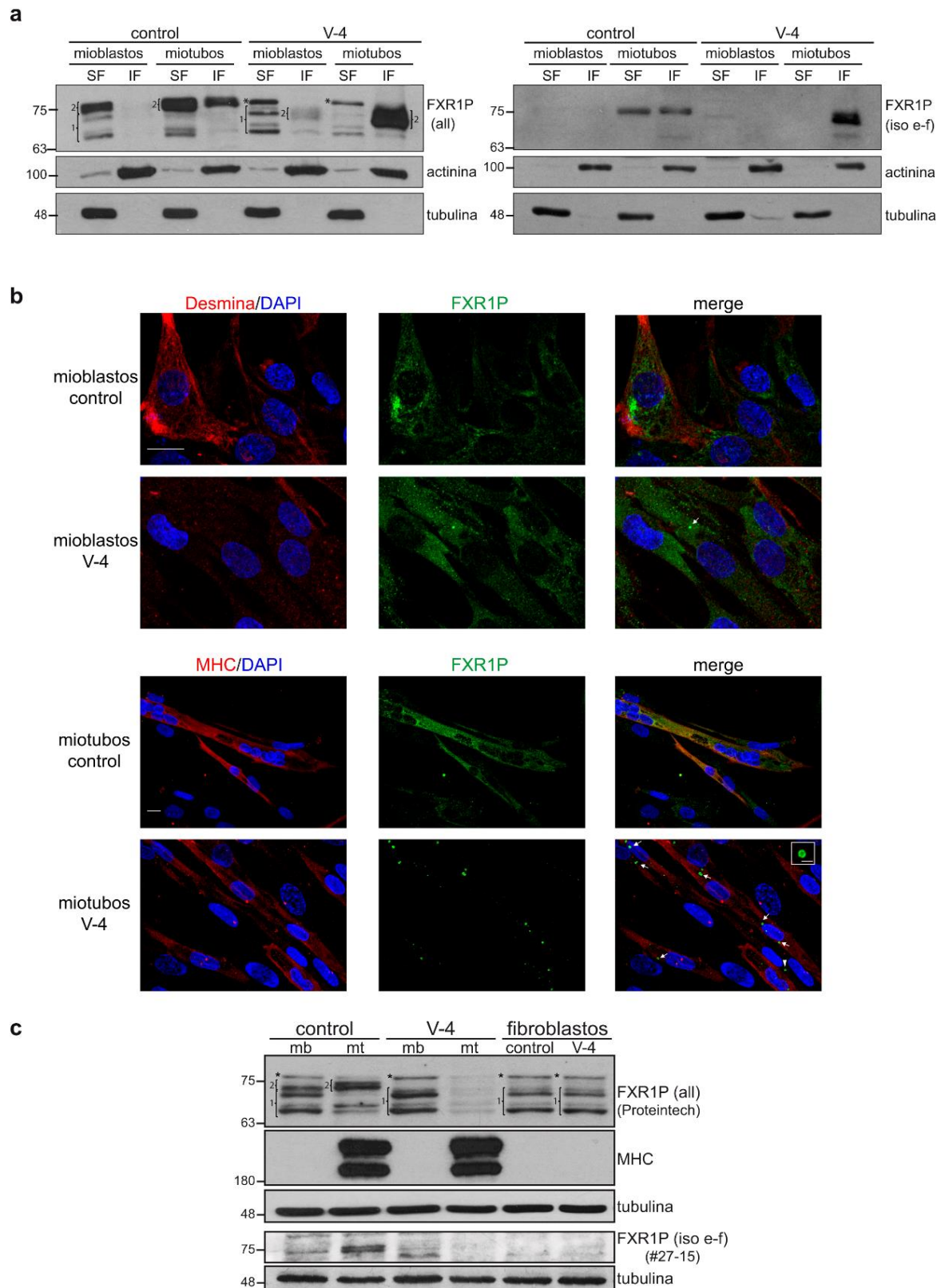


Figura 15. Expresión y localización de las isoformas de FXR1P en cultivos primarios de la familia 1. a) Inmunoblot con anti-FXR1P de las fracciones soluble (SF) e insoluble (IF) de extractos proteicos de mioblastos y miotubos en cultivo de un individuo control y del individuo afectado V-4 de la familia 1, n = 5. Las proteínas α -actinina y α -tubulina se usaron como control de carga. b) Análisis por inmunofluorescencia de FXR1P en mioblastos y miotubos control y de V-4, n = 5. Barras de escala = 15 μ m. Las flechas

en los mioblastos y miotubos de V-4 indican acumulaciones en gránulos con forma de anillo de las isoformas P82-84 mutantes. El gránulo aumentado en los miotubos de V-4 está indicado con una punta de flecha (Barra de escala = 2 μ m). Desmina y MHC se utilizaron como marcadores miogénicos, siendo MHC indicador de la diferenciación a miotubo. Los núcleos se tiñeron con DAPI. c) Inmunoblot representativo que muestra la expresión de las isoformas de FXR1P únicamente en la fracción soluble (SF) de extractos proteicos de mioblastos (mb), miotubos (mt) y fibroblastos de un control y de V-4, n = 3. No hay variaciones en los niveles de las isoformas de FXR1P detectadas entre fibroblastos control y los del paciente V-4. Se utilizaron mb y mt de un control y de V-4 como control positivo para las iso-e/f. MHC y tubulina sirven como control de la diferenciación a miotubo y de cantidad de proteína cargada respectivamente. En a) y c) se usó un anticuerpo frente a todas isoformas de FXR1P (Proteintech) y otro específico de las iso-e/f (#27-15, Fig. 17c) en los paneles izquierdo y derecho de a) y arriba y debajo de c) respectivamente. Los números entre paréntesis designan las isoformas de FXR1P cuyo peso molecular está entre 70-80 KDa (1) y las isoformas de 82,84 KDa (2). El asterisco indica una banda inespecífica.

Los mioblastos delACAG tienen reducida la capacidad de formar miotubos

Se han descrito mutaciones en distintos genes relacionados con enfermedades neuromusculares, que pueden afectar a la capacidad de fusión de mioblastos en cultivo (Blondelle et al., 2015; Bricceno et al., 2014; Wilding et al., 2014). Para analizar si este proceso se encontraba alterado como consecuencia de la mutación delACAG, se sembraron cultivos primarios de mioblastos del paciente V-4 de la familia 1 y de un control y, tras 5 días de diferenciación, se analizó el índice de fusión, calculado como el número de núcleos en miotubos dividido por el número total de núcleos en mioblastos y miotubos. Los miotubos se definieron como células positivas para MHC con dos o más núcleos. El resultado de este experimento mostró que los mioblastos con la mutación delACAG en el exón 15 de *FXR1* presentaban una reducción significativa de su capacidad de formación de miotubos (Fig. 16a-b). Asimismo, se observó que los miotubos de V-4 formados tras el proceso de diferenciación contenían menos núcleos por célula que los miotubos provenientes de la diferenciación de mioblastos control, sin que se llegara a observar miotubos de V-4 con más de 4 núcleos (Fig. 16c-f).

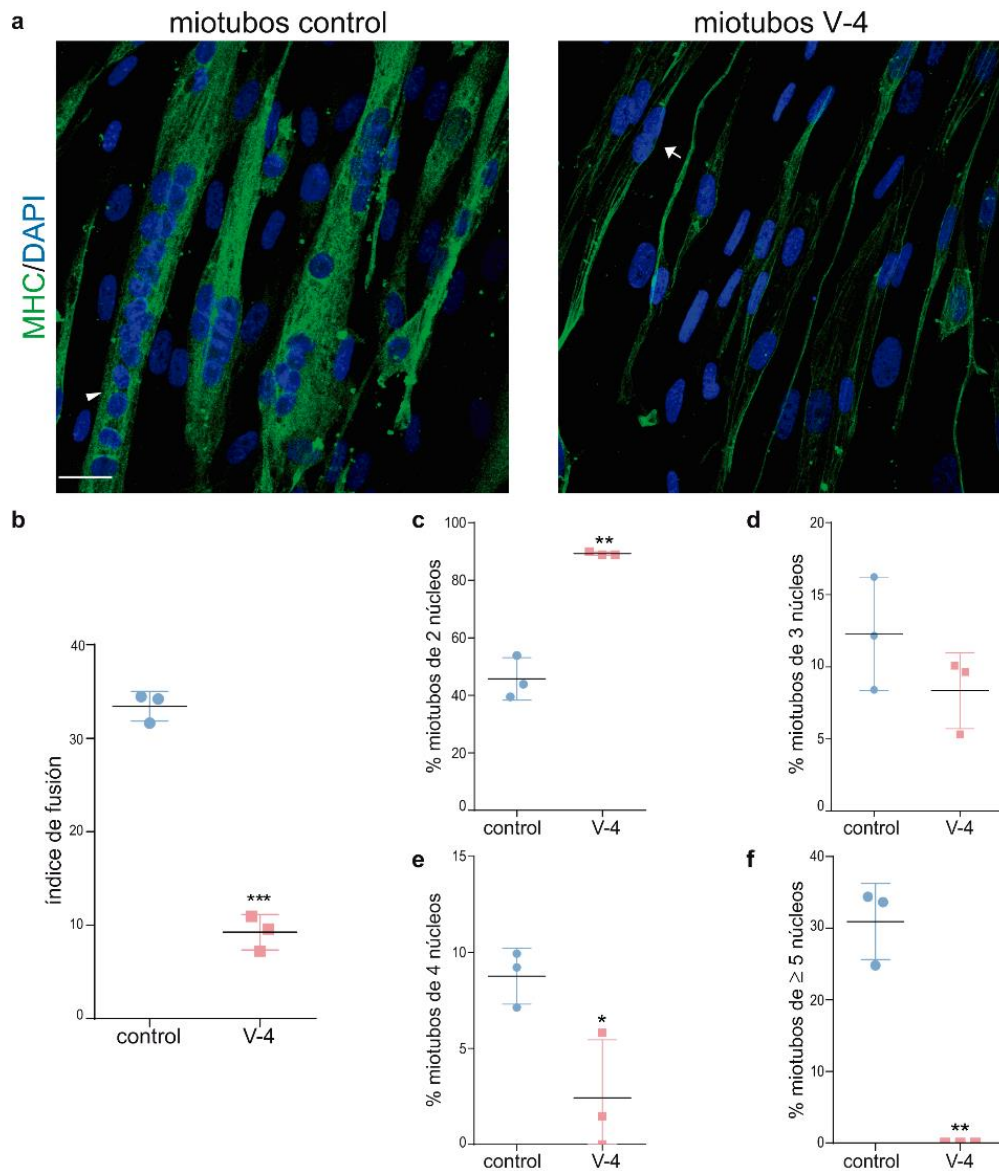


Figura 16. Análisis del impacto de la mutación delACAG en el proceso de diferenciación de mioblastos. a) Imágenes representativas de microscopía confocal (proyección máxima) donde se muestran miotubos marcados con anti-MHC (verde) y los núcleos con DAPI (azul) en cultivos primarios de mioblastos control y del paciente V-4 de la familia 1, mantenidos en medio de diferenciación durante 5 días. Se observa una mayor cantidad de miotubos multinucleados, con más de dos núcleos, en el cultivo control en comparación con los miotubos de V-4. Como ejemplo, la punta de flecha señala un miotubo control con más de 5 núcleos. La flecha indica un miotubo de V-4 binucleado. Barra de escala = 25 μ m. b) Índice de fusión calculado como el número de núcleos en miotubos dividido por el número total de núcleos en mioblastos y miotubos. Los miotubos se definieron como células positivas para MHC con dos o más núcleos. c-f) Porcentaje de miotubos con 2, 3, 4 o ≥ 5 núcleos respectivamente. Los gráficos representan la media \pm SD seguido de un análisis estadístico *t*-Student paramétrico en b), d) y e), y con una corrección de Welch en c) y f); n = 3 experimentos independientes, analizando entre 3-5 imágenes de cada tipo celular en cada experimento.

Ratones con diferentes mutaciones del exón 15 de *Fxr1* muestran fenotipos miopáticos variables

Para estudiar la patología asociada a la variante delACAG, esta mutación se replicó en ratones utilizando la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9. La secuencia de *FXR1* humana y de ratón presentan una identidad del 95%, y la eliminación de los cuatro nucleótidos equivalentes a la mutación humana en el ratón (NM_001113188.1:c.1764_1767delACAG; p.Arg588Serfs*37), también conduce a la sustitución de los últimos 90 aminoácidos de las iso-e/f murinas por 36 nuevos residuos, los cuales son idénticos a los 36 aminoácidos adicionales de la proteína mutante de la familia 1. Esta línea de ratones fue denominada delACAG. Durante la edición genética, se generó en paralelo otra línea de ratón portadora de una mutación distinta en el exón 15, consistente en la duplicación de un nucleótido de adenina (NM_001113188.1:c.1766dupA). A esta línea murina se la denominó dupA. Este nuevo alelo también origina un cambio en el marco de lectura de *Fxr1*, el cual da lugar a un PTC 10 tripletes aguas abajo de la mutación situado dentro del exón 16 (p.Pro590Alafs*10). A diferencia de la mutación delACAG, los transcritos portadores de la mutación dupA, supuestamente, deberían estar sometidos a NMD (Fig. 13 y 17).

Los mutantes homocigotos de ambas líneas CRISPR nacieron en proporción mendeliana ($\chi^2_{2g,1(p=0,05)} < 5,99$) y sobrevivieron hasta la edad adulta, pero desarrollaron un fenotipo muscular, que era más grave en el caso de los ratones delACAG. Los homocigotos delACAG (a partir de ahora delACAG) eran más delgados que sus hermanos de camada a simple vista (Fig. 18b) y su peso corporal era menor que el de los animales wt del mismo sexo y edad. Las disminuciones medias de peso determinadas en hembras delACAG a las 6, 9 y 12 semanas de periodo postnatal, resultaron ser de un -15,56 %, -20,94 % y -16,43 % (Fig. 18a). No se observó fenotipo en ratones heterocigotos delACAG. Los mutantes homocigotos dupA (a partir de ahora dupA) eran indistinguibles del resto de miembros de la misma camada a simple vista (Fig. 18b), pero también presentaron una disminución del peso corporal en comparación con los controles, aunque de menor grado que la observada en los ratones delACAG. La reducción media del peso corporal de ratones hembra dupA a las 6, 9 y 12 semanas de edad fue -2,53 %, -7,58% y -6,97% respectivamente (Fig. 18a). Después de la disección de las extremidades posteriores y el gastrocnemio, resultó evidente que los mutantes delACAG tenían menor cantidad de masa muscular (Fig. 18c). Estos datos fueron corroborados mediante MRI calculando el volumen muscular correspondiente a un segmento fijo de las extremidades posteriores en ratones hembra de 14 semanas de edad. Este estudio reveló que el volumen muscular de los mutantes delACAG y dupA se encontraba disminuido en un 35% y 6,62% respectivamente con respecto a ratones wt (Fig. 18d-e).

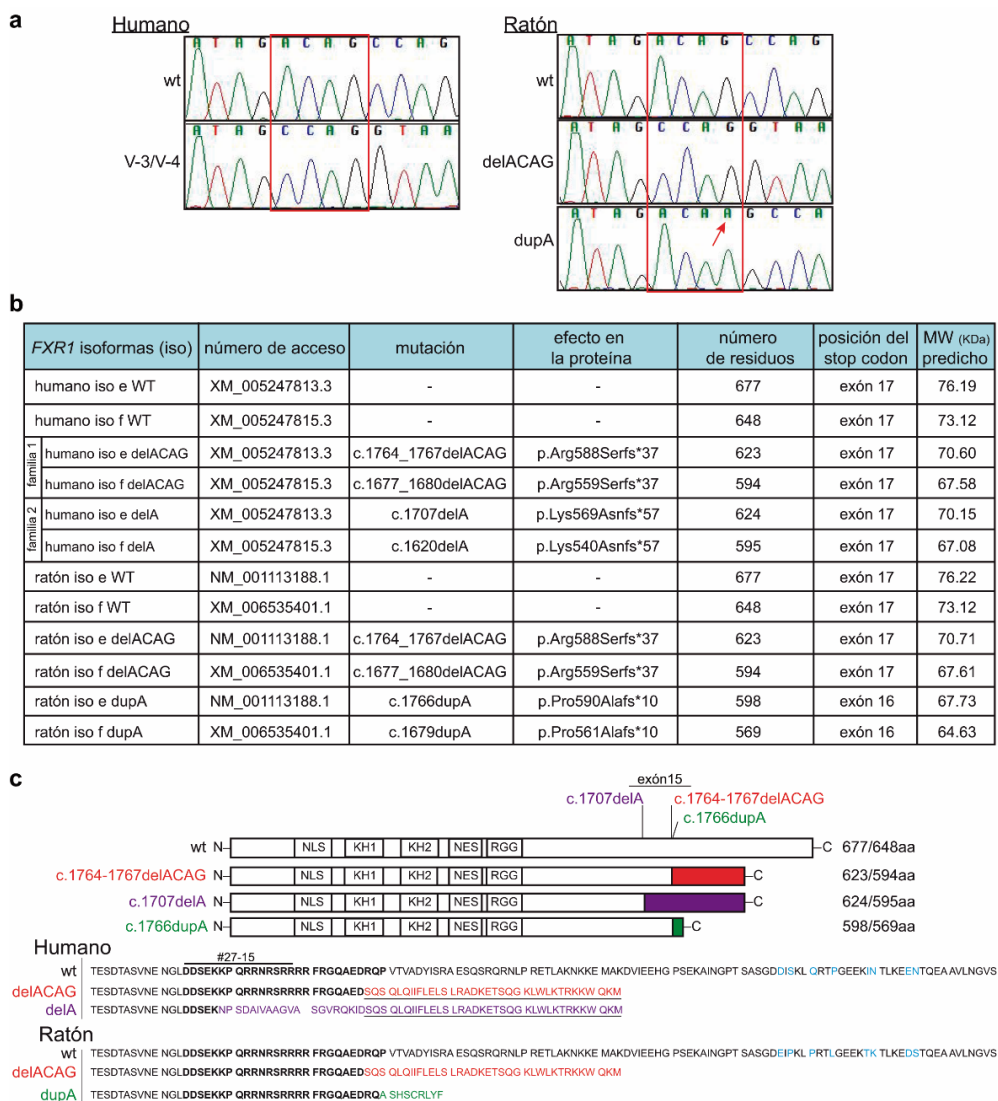


Figura 17. Resumen de las mutaciones en *FXR1* de pacientes y líneas murinas CRISPR. a) Cromatogramas de la secuencia de *FXR1* de un individuo normal (wt) y los pacientes de la familia 1 (V-3 y V-4) que comprende la delección de nucleótidos ACAG en homocigosis (recuadrada en rojo), junto a la secuencia correspondiente del exón 15 de *Fxr1* en ratones CRISPR con genotipo homocigoto para la secuencia normal (wt), delACAG o dupA. La adenina individual duplicada en ratones dupA está comprendida dentro de los cuatro nucleótidos eliminados en los mutantes delACAG, y está señalada con una flecha roja. b) Descripción de las mutaciones encontradas en pacientes y las generadas en ratones CRISPR. Se muestran las secuencias de referencia de las iso-e/f, la posición de la mutación, el efecto sobre la proteína, el número total de residuos aminoacídicos, la posición del PTC y el peso molecular esperado de las proteínas mutantes. c) Panel superior: representación esquemática de las proteínas normales (wt) y mutantes, donde se muestra la posición de las mutaciones, los dominios funcionales según lo descrito por Dubé et al., 2000, y el efecto sobre la proteína de cada mutación. Las variantes delACAG (familia 1 y ratones delACAG), delA (familia 2) y dupA (ratones dupA) provocan la sustitución de los últimos 90, 109 y 88 aminoácidos del extremo Ct de las iso-e/f normales por 36 (recuadro rojo), 56 (recuadro morado) y 9 (recuadro verde) nuevos residuos respectivamente. Panel inferior: comparación de la secuencia de aminoácidos del extremo Ct de las iso-e/f wt y mutantes de humano y ratón. Los nuevos residuos incorporados debido a las mutaciones delACAG, delA o dupA están en rojo, morado y verde, respectivamente. Las letras azules designan aminoácidos no conservados entre la secuencia humana y la murina. Los aminoácidos correspondientes al exón 15 están en negrita. Las proteínas delACAG y delA comparten sus últimos 37 residuos (aminoácidos subrayados). El péptido utilizado para generar el anticuerpo #27-15 específico de iso-e/f está indicado.

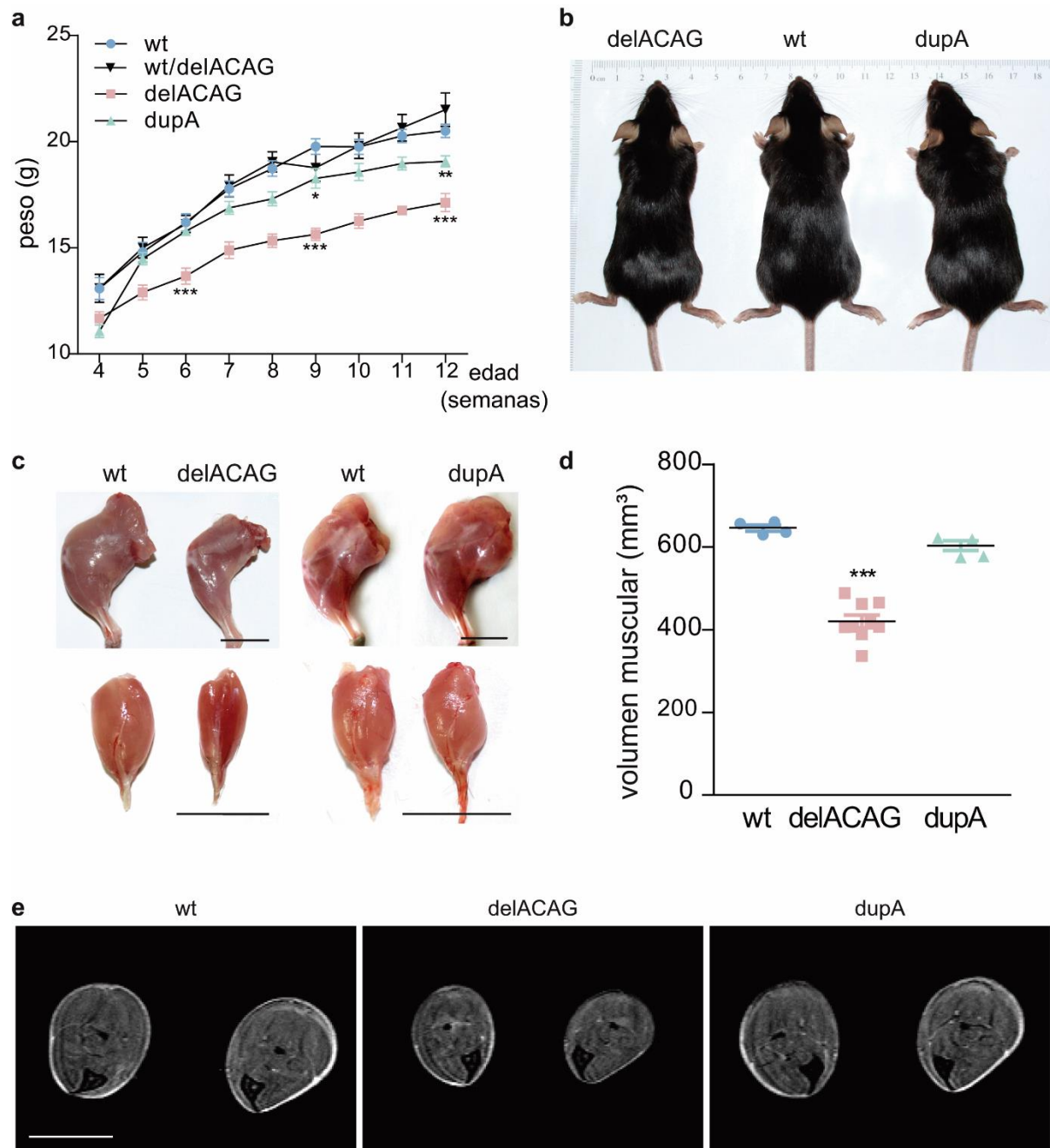


Figura 18. Caracterización del fenotipo de ratones con diferentes mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*. a) Gráfico de crecimiento de ratones homocigotos delACAG y dupA en comparación con los controles wt y los heterocigotos wt/delACAG. Para este análisis se pesaron semanalmente ratones hembras desde la semana 4 hasta la 12 de edad. $n = 16$ (wt), 13 (wt/delACAG), 12 (delACAG), 9 (dupA). La gráfica representa la media \pm SEM con un análisis estadístico mediante una prueba *t*-Student. b) Imagen representativa de ratones hembra delACAG, wt y dupA de 3 meses de edad. c) Imágenes representativas de la extremidad posterior izquierda (panel superior) y gastrocnemio (panel inferior) de mutantes delACAG y dupA en comparación con ratones wt de la misma camada (ratones hembra de 3 meses de edad). Barra de escala = 1 cm. d) Volumen muscular correspondiente a un segmento de las extremidades posteriores determinado por MRI en ratones hembra de 14 semanas. $n = 4$ (wt), 9 (delACAG), 4 (dupA). Los valores corresponden a las medias \pm SD analizados mediante ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-hoc para comparar entre grupos. e) Imagen representativa de una sección de las extremidades posteriores capturada por MRI (3 secciones por debajo de la meseta tibial) de ratones wt, delACAG y dupA, ilustrando las diferencias en la masa muscular. $n = 4$ (wt), 9 (delACAG), 4 (dupA). Barra de escala = 5 mm.

Posteriormente, se analizó la función del músculo esquelético en ambos tipos de ratones mutantes del exón 15. La fuerza del músculo se evaluó, en ratones hembras de 14 semanas de edad, comparando la capacidad de cada ratón de levantar un determinado peso, así como a través del test “hanging wire”, mientras que la resistencia a la fatiga se determinó mediante una prueba de ejercicio sostenido en rotarod. En todas las pruebas, los ratones delACAG obtuvieron puntuaciones significativamente más bajas que sus compañeros de camada wt, mientras que los ratones dupA tuvieron un rendimiento similar o ligeramente inferior al de los controles (Fig. 19a-c). Se realizó también un estudio de pisada y coordinación al andar, mediante un análisis de footprint comparando animales delACAG y wt. Los animales delACAG presentaron una longitud de zancada más corta y una ligera alteración en el patrón de coordinación al caminar (Fig. 19d-e), similar a la observada en ratones *Fxr1-neo* por Meintjes et al. 2004.

La densidad mineral ósea está disminuida en ratones delACAG

Debido a que, tanto en el probando de la familia 1 como en su hermana afectada (V-2), se detectaron fracturas de húmero y fémur, se evaluó la densidad mineral ósea (DMO) en los modelos de ratón CRISPR usando absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). La DMO calculada tanto en el fémur como en las vértebras lumbares resultó ser significativamente menor en mutantes delACAG con respecto a los wt de la misma camada: -21,36% en el fémur, -20,25% en la columna vertebral. También se observaron diferencias más leves de DMO entre los ratones dupA y control, pero no fueron estadísticamente significativas (Fig. 20a-b). Las radiografías de las extremidades diseccionadas también demostraron una disminución cualitativa del DMO en ratones delACAG (Fig. 20c). Las imágenes obtenidas por DEXA también revelaron la existencia de una desviación de la columna vertebral en los ratones delACAG (Fig. 20a).

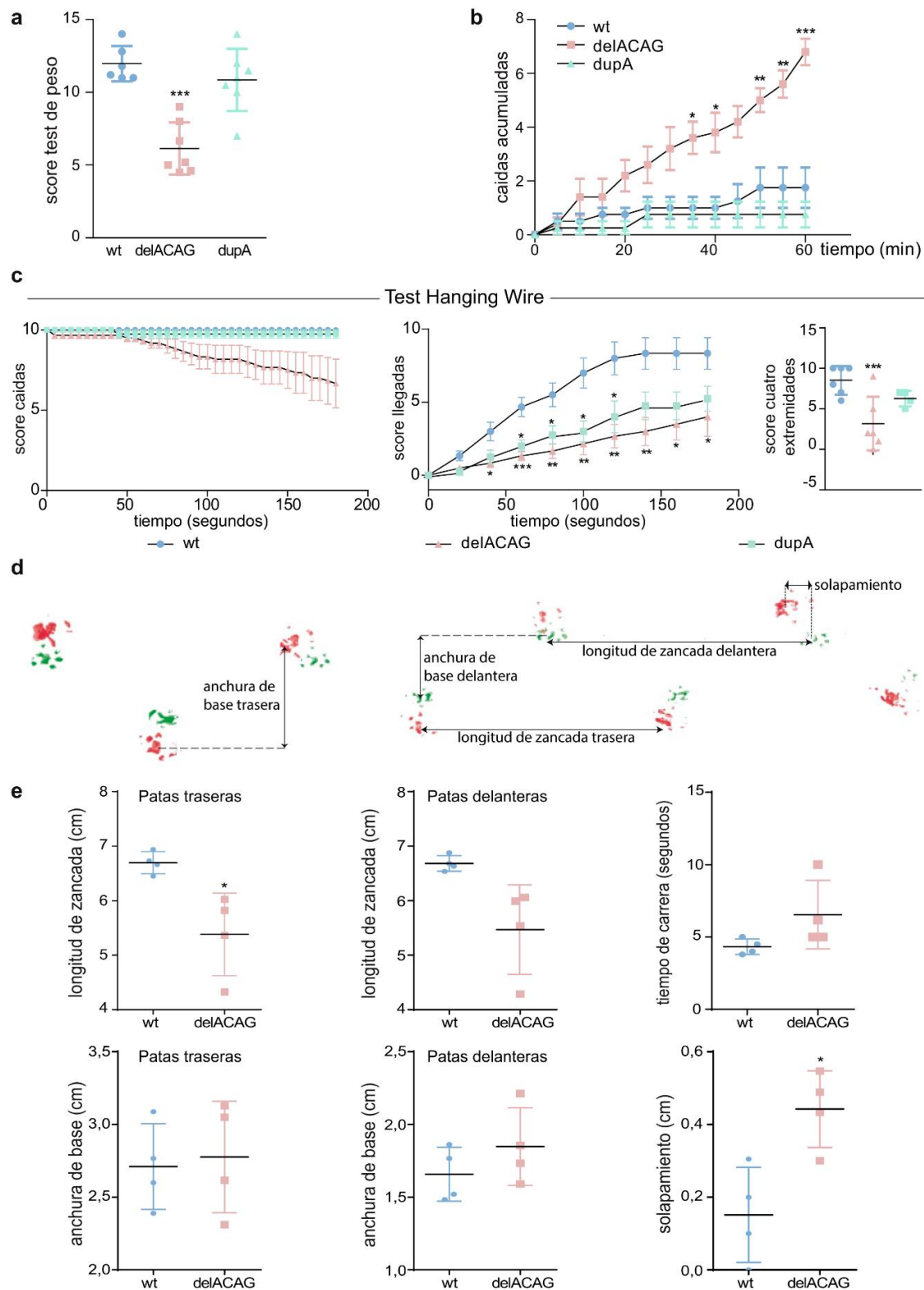


Figura 19. Test funcionales en ratones con diferentes mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*. a) Puntuación para la prueba de peso, $n = 6$ (wt), 7 (delACAG), 7 (dupA). La gráfica representa la media \pm SD seguido de un análisis ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-hoc para comparar entre grupos. b) Número acumulado de caídas durante la prueba de resistencia en rotarod, $n = 4$ (wt), 5 (delACAG), 4 (dupA). La gráfica representa la media \pm SEM seguido de una ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-hoc para comparar entre grupos. c) De izquierda a derecha: gráficas de la puntuación en “caídas”, “llegadas” y “cuatro extremidades” correspondientes al test de “hanging wire”. $n = 6$ (wt), 6 (delACAG), 4 (dupA). Los datos están representados como la media \pm SEM

(caídas y llagadas) o la media \pm SD analizados mediante ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-test. En su conjunto, los tests muestran un rendimiento peor por parte de los mutantes delACAG, y un resultado intermedio en los ratones dupA. d) Imagen representativa de una carrera de footprint donde se indican por una línea con flechas a ambos lados las variables medidas. Las patas traseras se marcaron con pintura roja y las delanteras con pintura verde. e) Panel superior, de izquierda a derecha: gráficas de las variables longitud de zancada de patas traseras y delanteras y del tiempo de carrera. Panel inferior, de izquierda a derechas: gráficas de las variables de anchura de base de las patas traseras y delanteras y del solapamiento entre pata trasera y delantera. Las gráficas muestran la media \pm SD analizada con un *t*-test de Student. Todas las variables fueron medidas en $n \geq 2$ carreras de footprint por cada animal, considerando como carrera aquella en la que se obtenía una buena visualización para la medición de un mínimo de tres zancadas seguidas. $n = 4$ animales por genotipo. Los animales delACAG presentan una ligera alteración en el patrón de coordinación. Todos los test en a-e) se realizaron en ratones hembras de 14 semanas de edad.

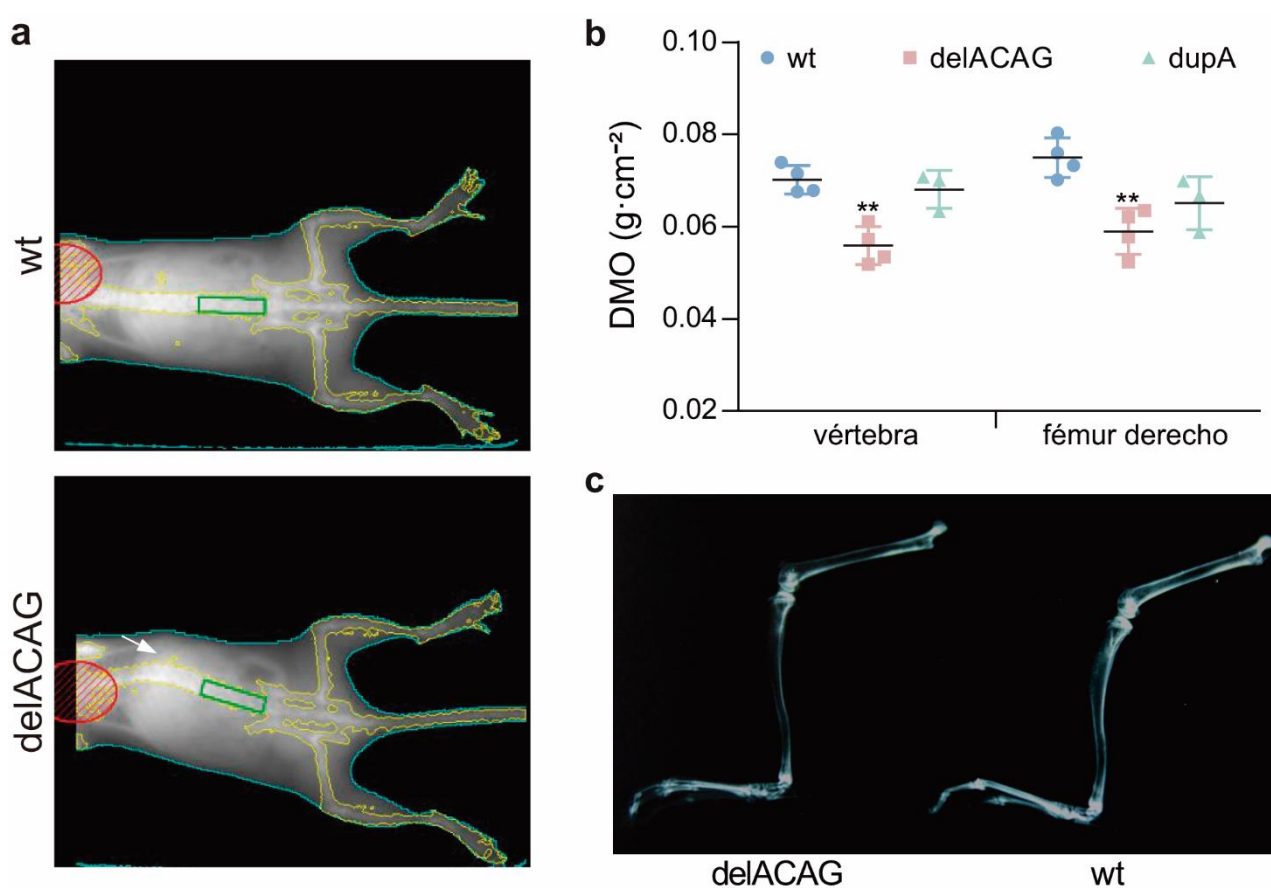


Figura 20. Fenotipo óseo de los ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. a) Imagen representativa de DEXA donde se muestra la desviación en la columna vertebral (flecha) en ratones delACAG. Esta desviación se observó únicamente en animales delACAG $n=3$. b) Densidad mineral ósea (DMO) calculada por DEXA en las vértebras lumbares y el fémur derecho de ratones hembra de 4 meses de edad. $n = 4$ (wt), 4 (delACAG), 3 (dupA). La gráfica representa la media \pm SD seguido de una ANOVA de una vía (**) con un Tukey post-hoc para comparar entre grupos. c) Imagen de rayos X representativa correspondiente a las extremidades posteriores izquierdas de ratones hembra de 4 meses de edad delACAG y wt, $n = 4$ (wt), 1 (wt/delACAG), 8 (delACAG), 4 (dupA).

Miopatía multi-minicore en ratones portadores de mutaciones en el exón 15 de *FXR1*

La caracterización histológica del músculo esquelético de ratones delACAG y dupA se realizó utilizando crio-secciones transversales de los músculos vasto lateral, gastrocnemio y sóleo. La tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de estas secciones en ratones mutantes y control reveló un tamaño de fibra reducido, mayor densidad celular (células/área) y un incremento en el número de núcleos centralizados en ambos tipos de ratones mutantes con respecto a los ratones wt control, siendo la magnitud de estos defectos mayor en los homocigotos delACAG. El valor medio del diámetro mínimo de Feret (MFD), determinado en el vasto lateral, se encontró reducido en un 41,56% en los mutantes delACAG y un 23,11% en los ratones dupA respecto a los ratones control. Por otro lado, el porcentaje de fibras con núcleos centralizados, analizado en el mismo músculo, resultó ser del 31,87% y 13,41% en mutantes delACAG y dupA respectivamente, valores muy superiores al encontrado en los ratones wt. Por otra parte, la tinción histoquímica NADH-TR, realizada también en el músculo vasto lateral, identificó áreas sin actividad enzimática, o cores, en un número elevado de fibras delACAG. En cambio, en ratones dupA solo se detectaron cores de forma esporádica. Por último, la tinción histoenzimática ATPasa a pH 4,3, la cual fue evaluada en secciones del músculo sóleo, puso de manifiesto un predominio de fibras tipo I en ambos mutantes, especialmente en ratones delACAG. La frecuencia relativa de fibras tipo I en el sóleo en ratones wt fue del 43,3%, mientras que en ratones delACAG fue del 90,4% y en mutantes dup A del 53,3% (Fig. 21-22).

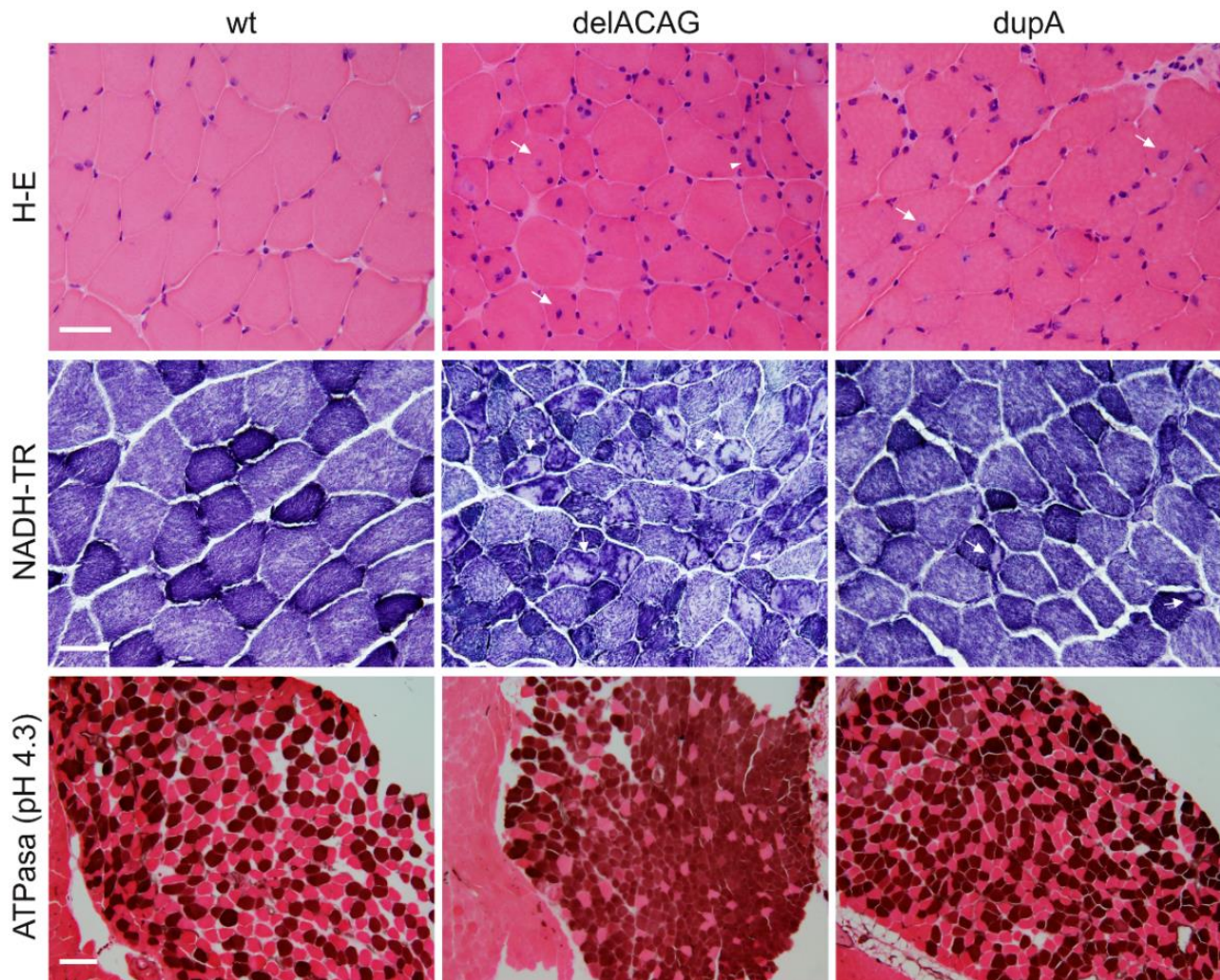


Figura 21. Histopatología del músculo esquelético de ratones portadores de mutaciones del exón 15 de *Fxr1*. Panel superior: tinción H-E de criosecciones del vasto lateral. Las flechas designan núcleos centralizados; la punta de flecha en delACAG indica una agrupación de varios núcleos centralizados en una misma fibra. Panel central: histoquímica de la enzima NADH-TR en criosecciones del vasto lateral que muestra la presencia de múltiples áreas sin actividad enzimática (cores) en ratones delACAG y muy pocas en ratones dupA. Las flechas representan ejemplos de core. Para ambos paneles: n = 7 (wt), 9 (delACAG), 3 (dupA) y barras de escala = 50 μ m. Panel inferior: histoquímica de ATPasa (pH 4,3) en criosecciones de sóleo completo demostrando incremento de fibras tipo I en ambos mutantes, n = 5 (wt), 6 (delACAG), 3 (dupA). Barra de escala = 0,5 mm.

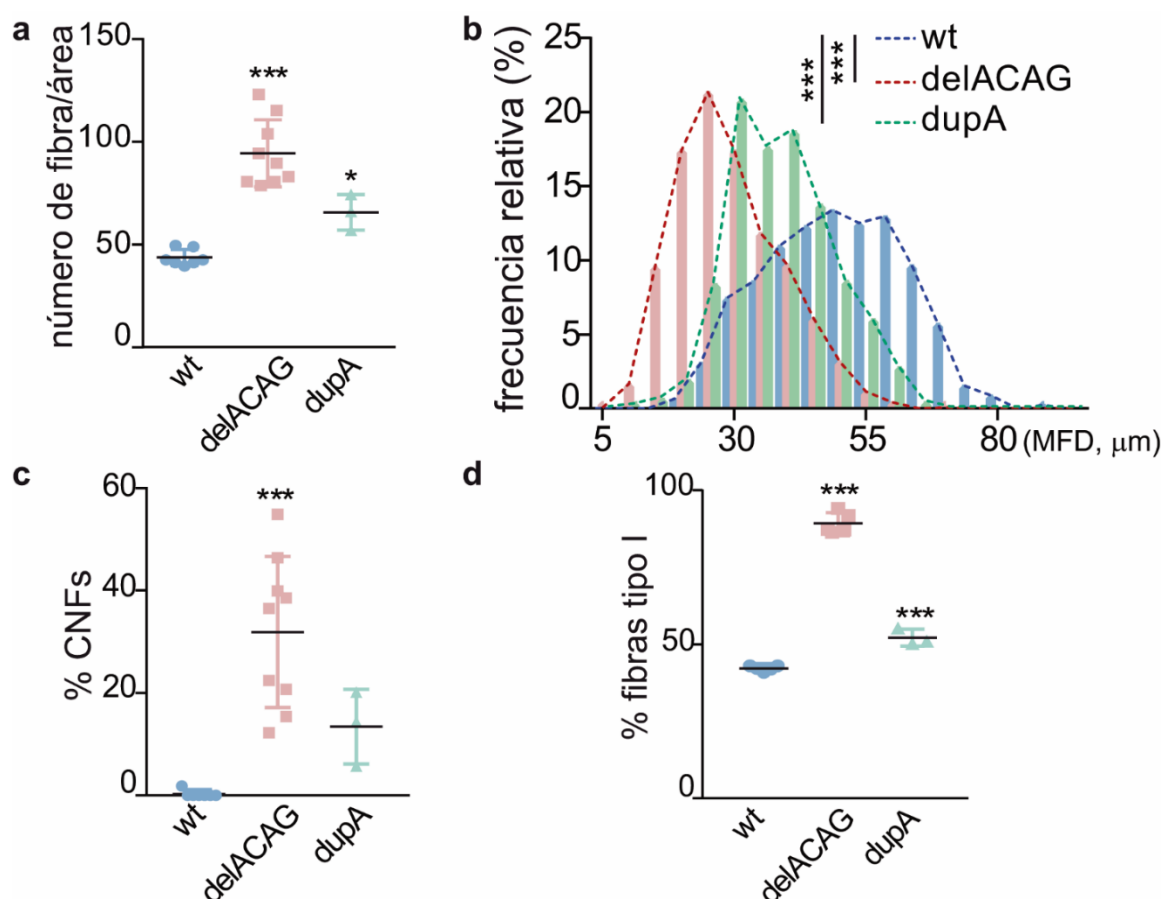


Figura 22. Análisis cuantitativo de la histopatología del músculo esquelético de ratones portadores de mutaciones del exón 15 de *Fxr1*. a) Cuantificación de la densidad de fibra (número de fibras/área). El gráfico representa la media \pm SD. b) Frecuencia relativa de los diferentes tamaños de fibra expresado como diámetro mínimo de Feret (MFD, μ m) con respecto al número total de fibras analizadas. Las diferencias en la media del MFD entre wt y homocigotos mutantes (wt: $49,8 \mu\text{m} \pm 1,9$ SD., delACAG: $29,1 \mu\text{m} \pm 9,9$ SD., dupA: $38,3 \mu\text{m} \pm 9,7$ SD) fueron estadísticamente significativas. c) Porcentaje de fibras con núcleos centralizados (% CNF) en ratones wt, delACAG y dupA. El gráfico corresponde a la media \pm SD. Para a-c) se utilizaron criosecciones con tinción H-E del vasto lateral y se analizaron un número total de fibras $n = 455$ (wt), 1726 (delACAG), 465 (dupA) correspondientes a de 7 (wt), 9 (delACAG) y 3 (dupA) ratones. d) Porcentaje (%) de fibras tipo I calculadas en secciones de sóleo expresadas como media \pm SD, $n = 5$ (wt), 5 (delACAG), 3 (dupA) ratones. Para el análisis estadístico se usó ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-hoc en a) y d) y Kruskal-Wallis (***) con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn en b) y c).

Adicionalmente, las fibras musculares del músculo gastrocnemio se sometieron a un análisis de ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En concordancia con la tinción de NADH-TR, la característica patológica predominante de las fibras delACAG fue la presencia de regiones intracelulares, de tamaño variable, definidas por la desintegración de la banda Z y pérdida de la estructura sarcomérica equivalentes a cores (Fig. 23a). La ultraestructura de las fibras delACAG al microscopio electrónico osciló desde fibras levemente afectadas, que solo contenían varias regiones de disrupción de la banda Z, hasta células altamente desorganizadas con un gran core extendido sobre casi toda la sección de la fibra. Además, se detectaron acumulaciones anormales de mitocondrias, y núcleos centralizados (Fig. 23b).

También se observó desalineamiento, engrosamiento, acortamiento irregular, y zigzaguo de las bandas Z en zonas con preservación de sarcómeros (Fig. 24a). El análisis por TEM de fibras dupA identificó irregularidades similares a las observadas en ratones delACAG en relación a la apariencia de las líneas Z y, ocasionalmente, se detectaron pequeñas áreas de disrupción de banda Z. Sin embargo, no se llegaron a observar cores, indicando que son poco frecuentes en estos ratones (Fig. 24b).

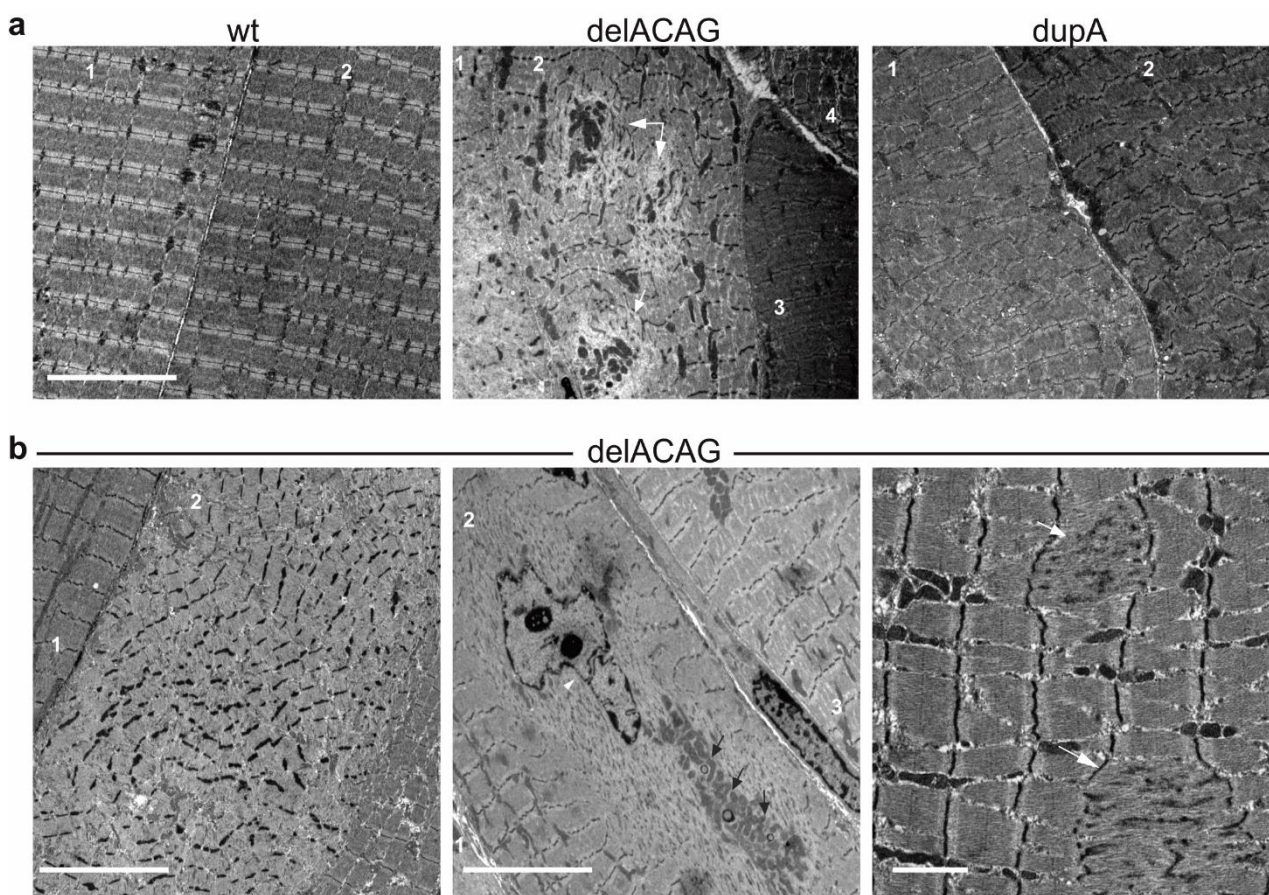


Figura 23. Análisis de la ultraestructura de las miofibras de ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. a) Imágenes TEM representativas de gastrocnemio de ratones wt, delACAG y dupA. Las flechas indican cores y los números diferentes fibras. Barra de escala = 10 μ m. b) Imágenes TEM de gastrocnemio indicando diferentes defectos en las fibras delACAG, tales como: grandes cores (imagen izquierda y central. Barras de escala = 10 μ m), núcleos centralizados (punta de flecha) y acumulaciones mitocondriales anormales (imagen central), y anomalías de la línea Z, incluida la disrupción de la banda Z (flechas, imagen derecha, barra de escala = 2 μ m). Los números indican diferentes fibras. Las flechas negras en la imagen central apuntan a gránulos en forma de anillo que se muestran a mayor aumento en la Figura 30.

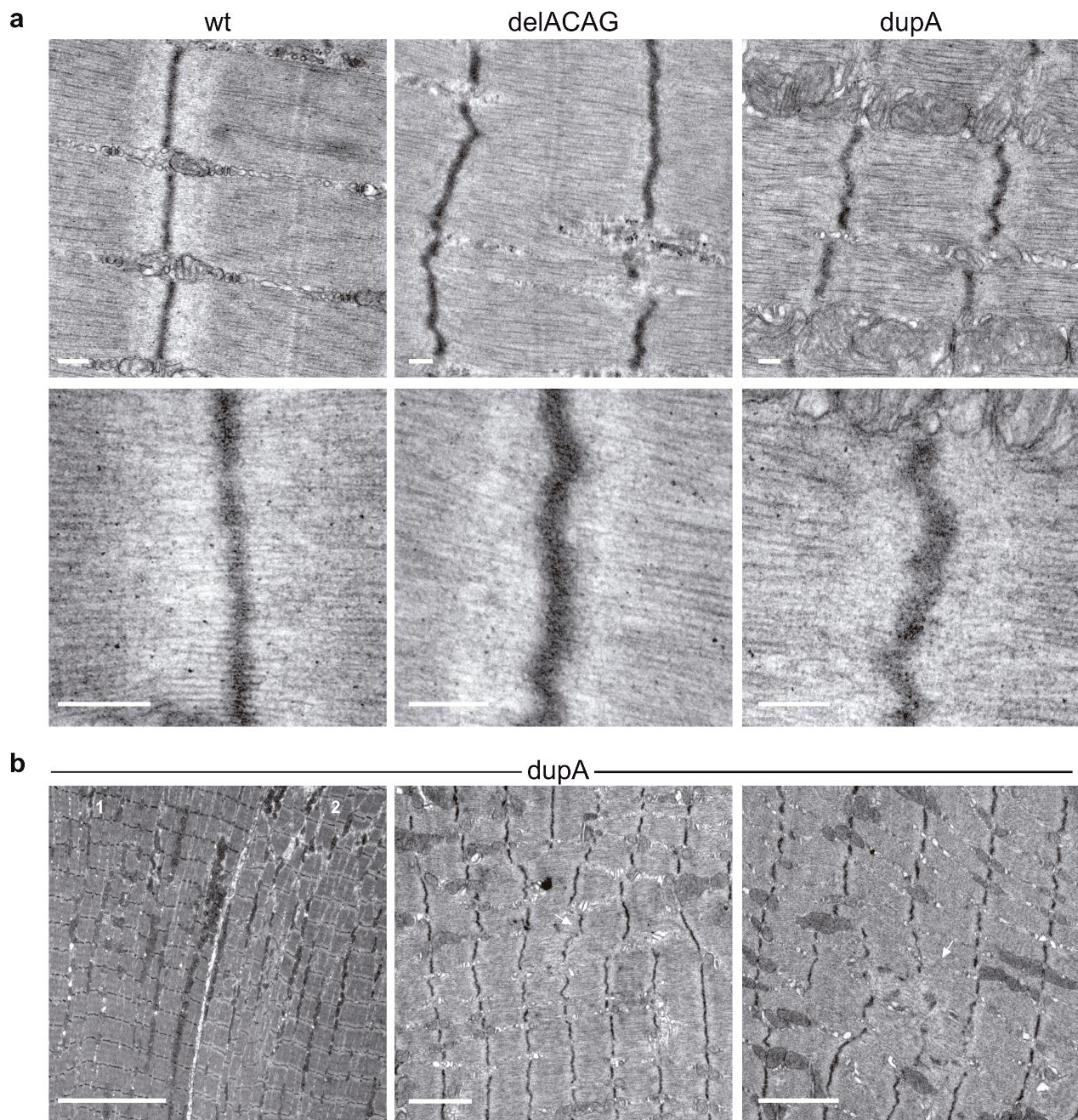


Figura 24. Alteraciones de la banda Z de ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. a) Imágenes TEM de gran aumento de fibras de gastrocnemio que muestran zigzagado, acortamiento y engrosamiento de las bandas Z en ratones mutantes delACAG y dupA en comparación con los wt. Barra de escala = 200 nm. n = 3 (wt), 4 (delACAG), 2 (dupA) ratones. b) Imágenes TEM representativas de fibras de gastrocnemio de ratones dupA. Las flechas indican áreas de disrupción de la banda Z. Barras de escala = 10 μ m en el panel izquierdo y 2 μ m en las imágenes central y derecha. Los números en el panel izquierdo identifican diferentes fibras.

Los resultados de la caracterización histológica del músculo esquelético de los ratones mutantes del exón 15 de *Fxr1*, coinciden con los obtenidos por el equipo de la Dra. Grace Yoon (The Hospital for Sick Children, Universidad de Toronto, Canadá) en el análisis histopatológico de una biopsia del músculo de un paciente de la familia 2 (Estañ et al., 2019). Dicho estudio reveló la presencia de fibras musculares de tamaño variable con un incremento en el número de núcleos centralizados, un elevado aumento de fibras de tipo I y múltiples lesiones de tipo mini-core en el tejido del paciente (Fig. 25).

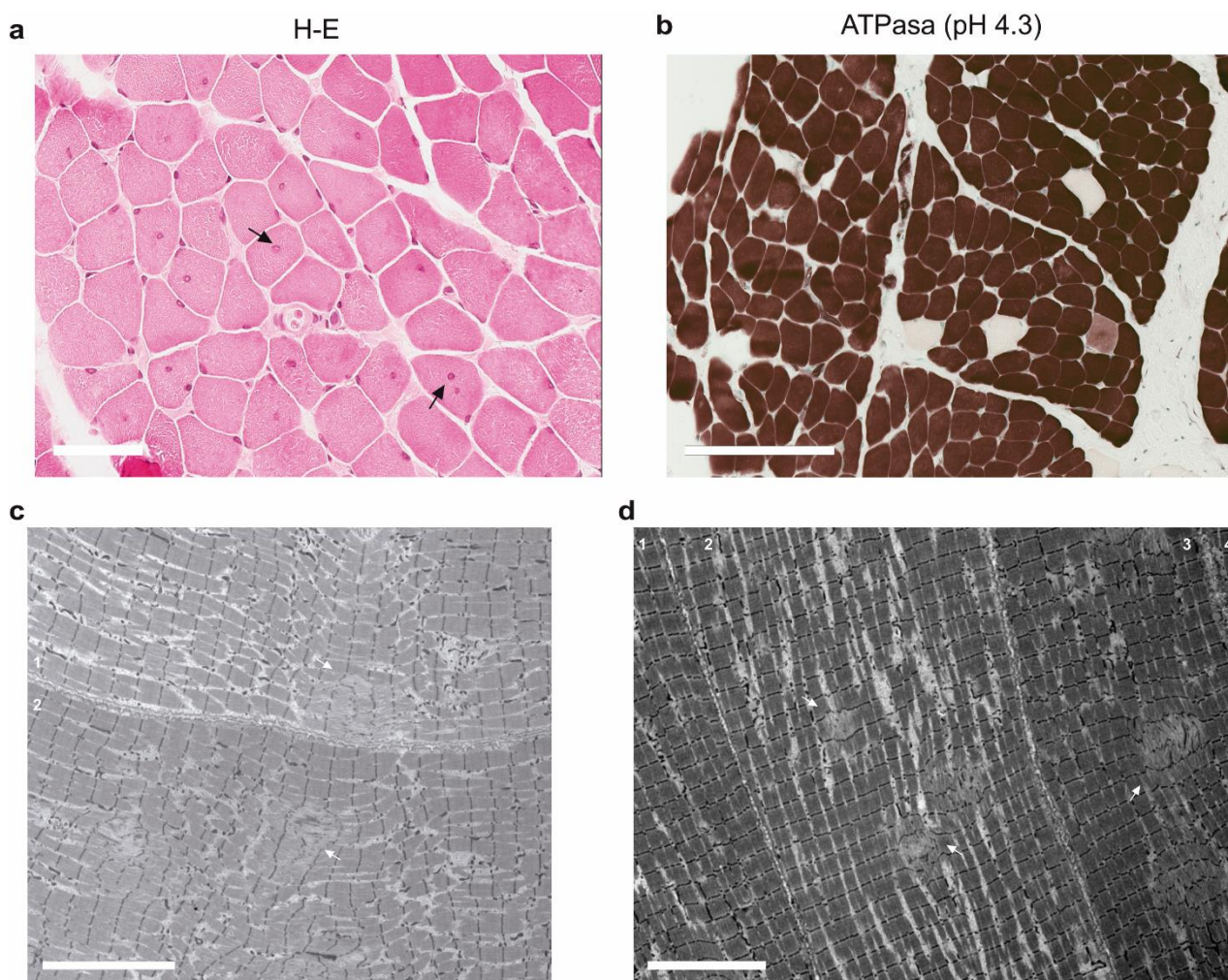


Figura 25: Histopatología de los pacientes de la familia 2 realizado en el laboratorio de la Dra. Grace Yoon (The Hospital for Sick Children, Universidad de Toronto, Canadá). Fotomicrografías representativas obtenidas a partir de una biopsia de tríceps derecho un paciente de la familia 2. (a) Tinción H-E. Barra de escala = 60 μm , (b) tinción histoenzimática ATPasa pH4,3. Barra de escala = 200 μm , y (c-d) TEM. Barra de escala = 10 μm . Las flechas indican núcleos centralizados en (a) y áreas con alteración de la banda Z y minicores en (c-d). Las diferentes fibras en las imágenes de TEM aparecen numeradas. Imágenes cedidas por la Dra. Grace Yoon y extraídas de Estañ et al. 2019.

Correlación entre el fenotipo miopático de las líneas murinas con mutación en el exón 15 de *Fxr1*, con la expresión y localización subcelular de las iso-e/f de FXR1P

Para comprender las diferencias en la gravedad del fenotipo entre los ratones delACAG y dupA, se llevó a cabo un estudio de la expresión de *Fxr1* tanto a nivel de ARNm, como de proteína en el músculo esquelético de ratones de estas dos líneas. Acorde con la hipótesis de la degradación del transcrito dupA por la vía de NMD, los resultados de RT-qPCR, en muestras de gastrocnemio en los que se utilizando dos sondas TaqMan de *Fxr1* diferentes, demostraron una reducción del 69,9% de la cantidad del ARNm de este gen en los mutantes dupA con respecto a los ratones wt. El mismo experimento reveló una disminución del 23,4% en los niveles de transcritos de *Fxr1* en ratones delACAG respecto a sus correspondientes ratones wt (Fig. 26a). Este dato podría indicar la interrupción de un mecanismo de retroalimentación positiva por parte de la mutación delACAG, ya que según las normas establecidas para NMD (Nagy & Maquat, 1998), esta variante no activa esta ruta de gradación de ARNm.

A continuación, se examinó la expresión de las proteínas FXR1P en el tejido muscular. El análisis por WB de FXR1P en extractos de gastrocnemio demostró una fuerte caída en los niveles de las isoformas musculares de FXR1P (P82-84) en los ratones dupA, detectándose solo una débil señal correspondiente al peso molecular esperado para las proteínas resultantes de esa mutación. Dicha proteína se encontró en la fracción soluble (SF) de los extractos musculares. En ratones delACAG, los niveles proteicos de las variantes P82-84 no parecían estar disminuidos, pero, al igual que lo ocurrido con los miotubos del paciente V-4, estas isoformas se encontraron principalmente en la parte no soluble (IF) de los lisados musculares (Fig. 26b). Posteriormente, se aislaron mioblastos a partir de tejido muscular en ambas líneas de ratón. El análisis por WB de los extractos proteicos de cultivos miogénicos primarios de estos ratones, identificó las isoformas mutantes dupA de FXR1P en la SF de los extractos celulares, aunque, al igual que en el tejido muscular, se necesitó exponer las membranas de WB por un largo periodo de tiempo para poderlas detectar, indicando que estaban presentes en el extracto en baja concentración. Las isoformas delACAG se encontraron en la IF de los lisados celulares (Fig. 28a).

A continuación, se utilizó microscopía confocal en fibras aisladas del músculo EDL para determinar la localización subcelular endógena de las iso-e/f normales y mutantes. En ratones wt, la inmunofluorescencia con anti-FXR1P identificó las variantes P82-84 en un patrón estriado perpendicular al eje principal de la fibra. En cambio, en las fibras dupA esta tinción se redujo casi por completo, mientras que en las fibras delACAG, al igual que en los miotubos V-4, las proteínas FXR1P se localizaron en numerosos gránulos citoplasmáticos de dimensiones variables (Fig. 27). Igualmente, estudios de inmunofluorescencia en cultivos primarios de mioblastos de estos ratones, mostraron una tinción citoplasmática de FXR1P en todos los genotipos en la etapa de mioblasto, con la presencia adicional de gránulos anulares exclusivamente en los cultivos de ratones delACAG. La expresión de FXR1P resultó estar prácticamente ausente en miotubos

diferenciados dupA, mientras que en miotubos delACAG se restringió a los agregados en forma de anillo, de forma idéntica a lo que se había detectado en miotubos de V-4 (Fig. 28b-c).

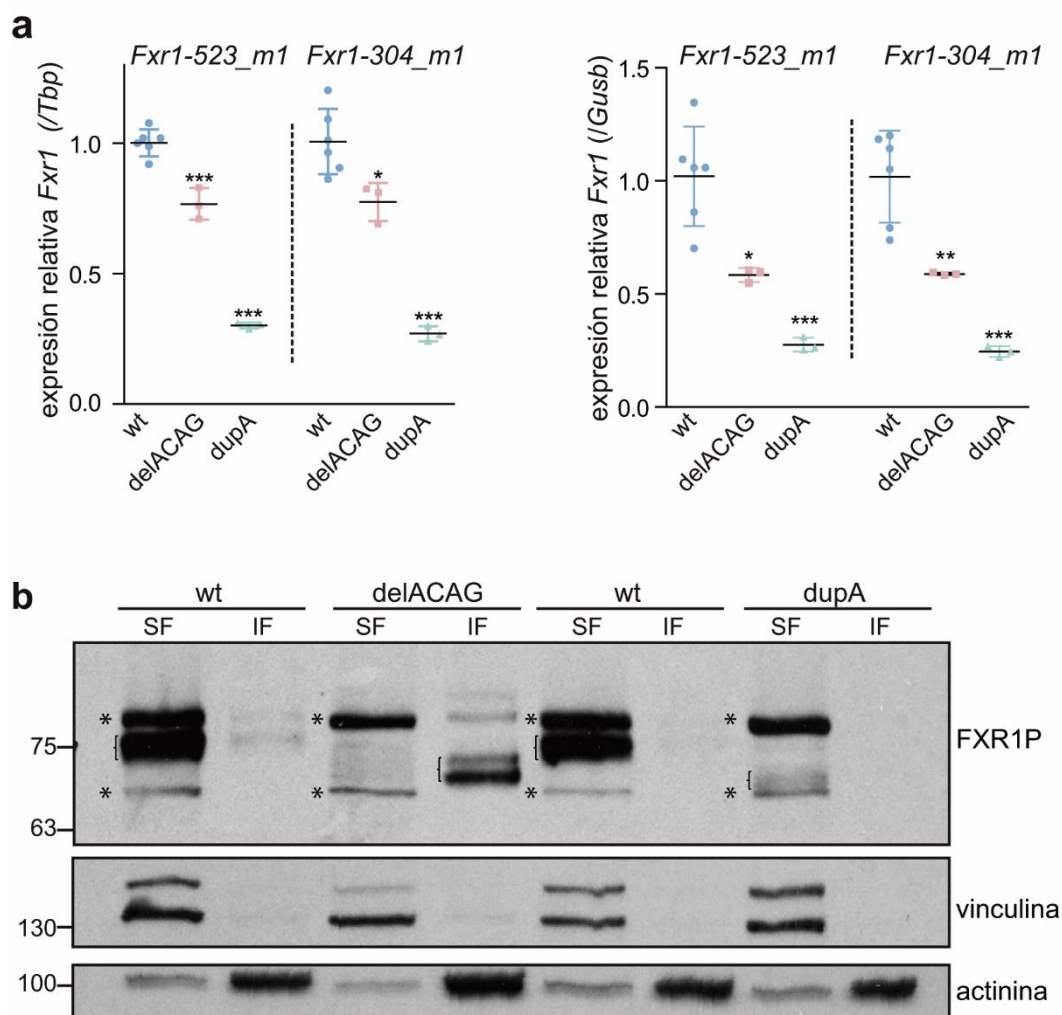


Figura 26. Expresión de las iso-e/f en ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. a) Cuantificación relativa de la expresión del ARNm de *Fxr1* en gastrocnemio de ratones de 2,5 meses de edad mediante RT-qPCR utilizando dos sondas TaqMan diferentes: *Fxr1-523_m1* (exones 2-3; *Mm00484523_m1*) y *Fxr1-304_m1* (exones 14-15; *Mm01286304_m1*). Los valores están referidos a los niveles de ARNm de los genes constitutivos *Tbp* (panel izquierdo), *Gusb* (panel derecho) y se representan como variación con respecto al valor medio de los ratones wt. n = 6 (wt), 3 (delACAG), 3 (dupA). Los datos se representan como las medias \pm SD analizados mediante ANOVA de una vía (***) con un Tukey post-test para comparar entre grupos. b) Inmunoblot con anti-FXR1P de extractos de proteínas de gastrocnemio (fracciones SF e IF) de ratones delACAG y dupA y sus correspondientes controles wt de la misma camada. Vinculina y α -actinina se utilizaron como controles de carga (ratones de 2 a 3 meses de edad, n = 4). Los corchetes denotan las iso-e/f y las bandas inespecíficas están marcadas con asteriscos.

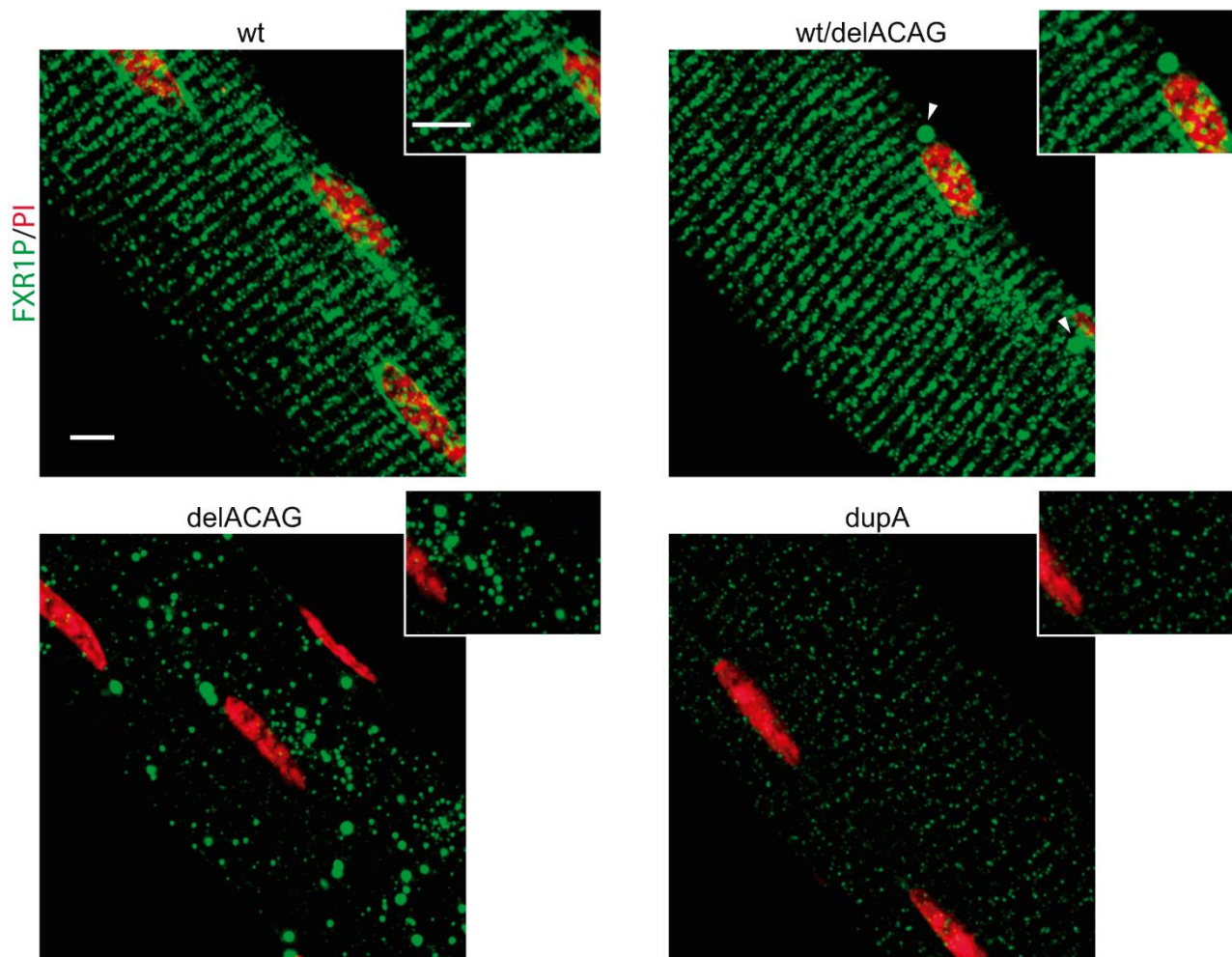


Figura 27. Localización subcelular de las iso-e/f en ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. Proyección máxima y detalle aumentado de imágenes de microscopía confocal correspondiente a experimentos de inmunofluorescencia con anti-FXR1P (verde) en fibras de EDL aisladas. n = 8 (wt), 3 (wt/delACAG), 8 (delACAG), 6 (dupA). Barras de escala = 5 μ m. Las isoformas de FXR1P se localizan en un patrón estriado perpendicular el eje principal de la fibra, excepto en las fibras delACAG donde se encuentran predominantemente en gránulos. La intensidad del marcaje de FXR1P es considerablemente menor en ratones dupA. Las fibras heterocigotas wt/delACAG contienen una pequeña cantidad de gránulos (puntas de flecha). Los núcleos están marcados con yoduro de propidio (PI, rojo).

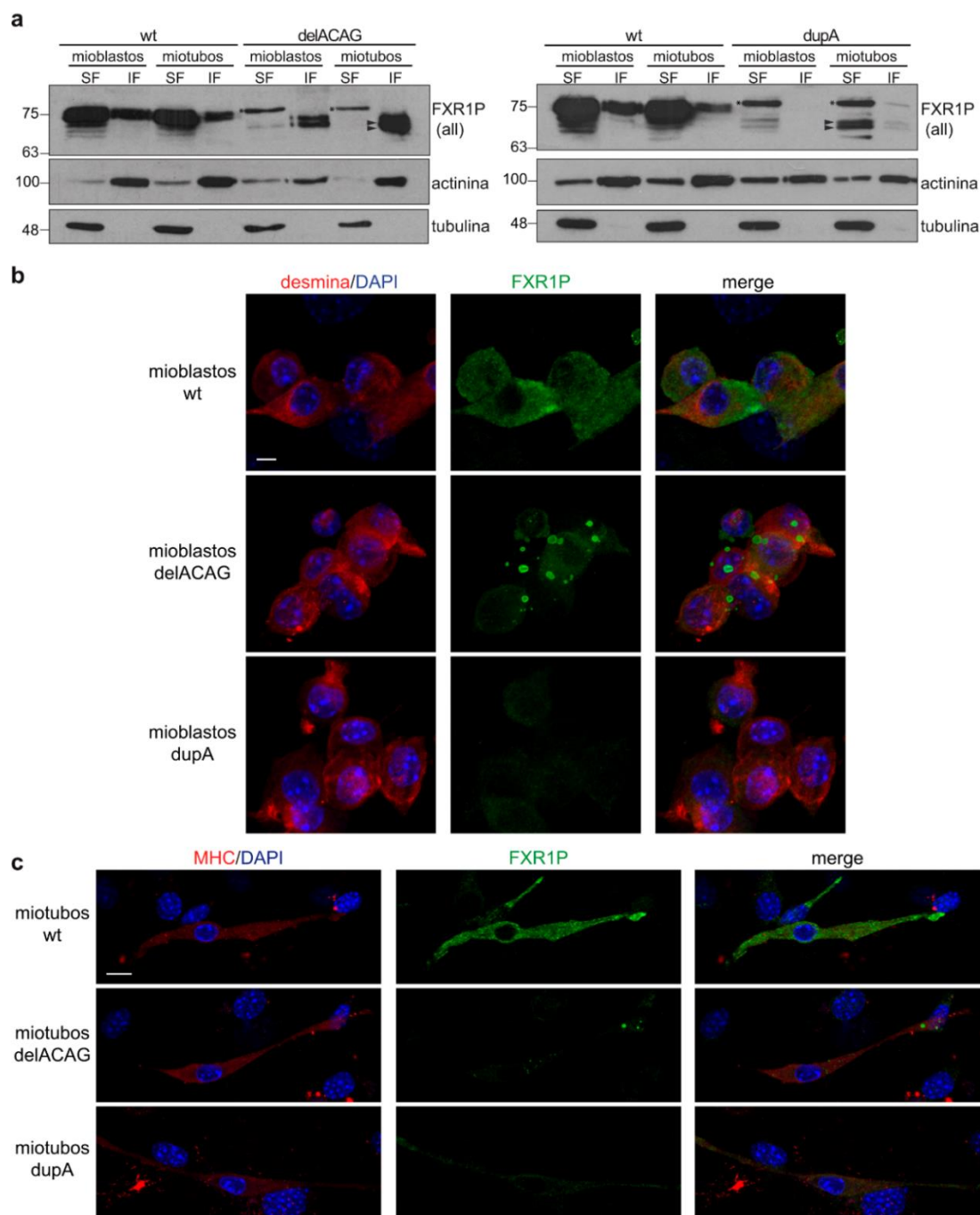
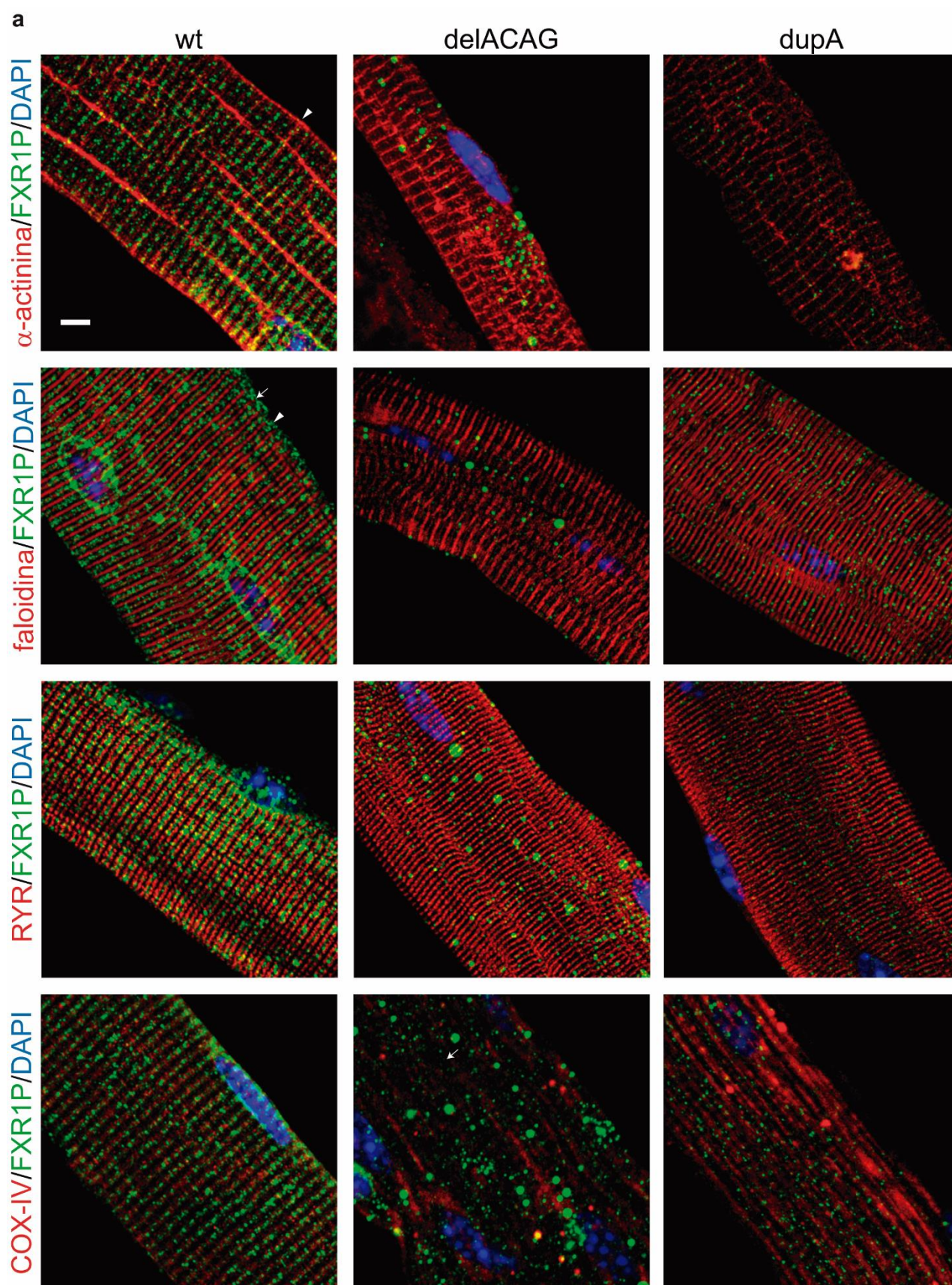


Figura 28. Expresión de FXR1P en células miogénicas primarias de ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1*. a) WB representativo con anti-FXR1P de las fracciones SF e IF de mioblastos primarios en proliferación ymiotubos diferenciados derivados de ratones delACAG (panel izquierdo) y dupA (panel derecho) y sus respectivos controles wt de la misma camada. Las variantes mutantes iso-e/f se indican con puntas de flecha. Se realizaron varias réplicas técnicas de este experimento, 3 (panel izquierdo) y 2 (panel derecho) usando células derivadas de ratones 3 (wt), 3 (delACAG) y 1 (dupA). Los asteriscos denotan una banda inespecífica b-c) Análisis de inmunofluorescencia confocal (proyección máxima) de FXR1P (verde) en mioblastos (b) y miotubos (c) cultivados de ratones wt, delACAG y dupA, mostrando gránulos FXR1P en forma de anillo exclusivamente en células delACAG desde la etapa de mioblastos, y una reducción importante de la señal de FXR1P en células dupA. La expresión de desmina y MHC (rojo) se utilizó como marcadores miogénicos, siendo MHC un indicador de diferenciación de miotubos. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se analizaron cultivos primarios de mioblastos de n = 4 (wt), 4 (delACAG), 2 (dupA) ratones. Barras de escala = 5 μ m en b, 10 μ m en c.

La distribución subcelular de las iso-e/f en el músculo esquelético de ratón había sido descrita previamente como un patrón de puntos cuya disposición recordaba a los costámeros asociados a las bandas Z, (Laetitia Davidovic et al., 2013; Dubé et al., 2000; Marc-Etienne Huot et al., 2005; Meintjes et al., 2004). En esta tesis se llevó a cabo un análisis de co-inmunomarcaje en fibras aisladas del músculo EDL para confirmar la localización de las isoformas P82-84 wt, y compararla con la de las proteínas mutantes. Los experimentos de co-inmunofluorescencia de FXR1P con α -actinina o faloidina, las cuales permiten visualizar las bandas Z y M respectivamente, identificó a las isoformas wt de FXR1P en una posición inmediatamente adyacente a la banda Z. Concordantemente, la doble inmunotinción de FXR1P con RYR, el cual es un marcador de las cisternas terminales del SR que forman parte de las tríadas, y COX-IV, marcador de mitocondrias, identificaron las variantes P82-84 wt entre las dos tríadas que flanquean cada banda Z, y solapando parcialmente con mitocondrias. El mismo análisis de inmunofluorescencia realizado en fibras dupA, reveló un marcaje residual de las correspondientes iso-e/f mutantes, pero con distribución subcelular comparable a las proteínas wt. En cambio, la señal de FXR1P en las fibras delACAG estaba prácticamente ausente de las líneas Z (Fig. 29 y 30). La inmunofluorescencia anti-COXIV mostró tanto acumulaciones mitocondriales como áreas privadas de mitocondrias (cores) en fibras delACAG, con una cierta proporción de gránulos delACAG superpuestos o situados cerca de grupos mitocondriales.



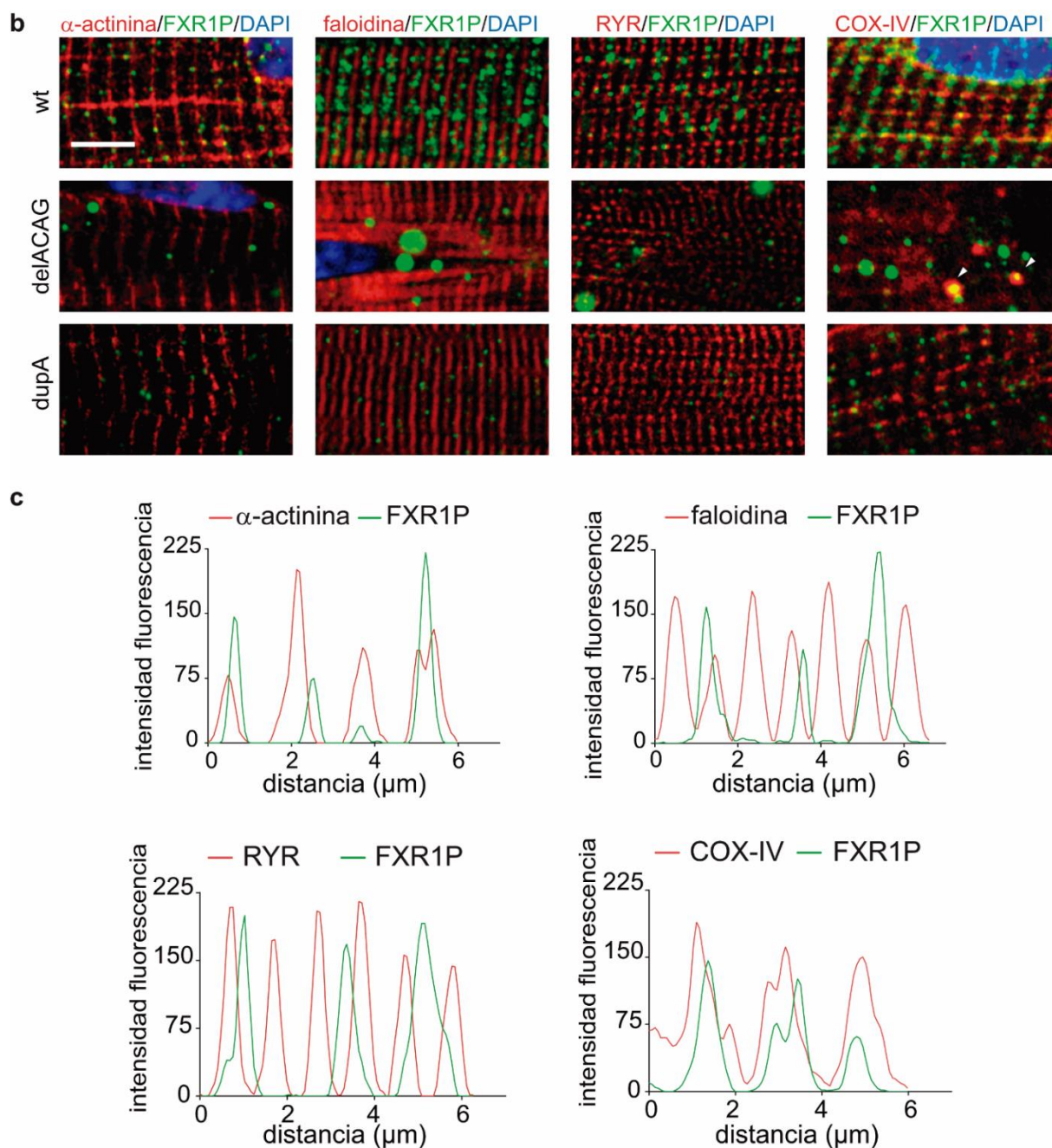


Figura 29. Localización subcelular de las iso-e/f en el músculo esquelético de ratón. a) Imágenes de microscopía confocal, proyección máxima, correspondientes a experimentos de co-inmunofluorescencia para FXR1P (verde) y α -actinina, faloidina, RYR o COX-IV (rojo) realizados en fibras de EDL aisladas de diferentes ratones. Las puntas de flecha designan las líneas Z. La flecha, en el panel de faloidina/FXR1P en fibras wt, señala la línea M. La flecha, en la imagen COX-IV/FXR1P en fibras delACAG, indica una lesión core con ausencia de marcaje para COXIV (mitocondrias). b) Igual que a) pero mostrando un plano único de microscopía confocal. Las puntas de flecha en la imagen COX-IV/FXR1P de fibras delACAG indican la localización conjunta de gránulos FXR1P y acúmulos mitocondriales. c) Perfil de intensidad RGB representativo calculado a lo largo de una línea en fibras de EDL wt de la imagen b), mostrando los resultados de co-localización entre FXR1P (verde) y marcadores sarcoméricos (rojo). FXR1P es adyacente a las bandas Z y mitocondrias y se localiza entre las dos tríadas. En a) y b) los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala = 5 μ m. Los experimentos se realizaron en n = 3 ratones, excepto RYR (n = 2 ratones). Para cada ratón se analizaron varias fibras en cada experimento.

Dada la distribución subcelular de las variantes delACAG en gránulos citoplasmáticos, se investigó la morfología de estas estructuras mediante TEM en cortes ultrafinos de gastrocnemio. Este análisis identificó una serie de estructuras citoplasmáticas globulares o en forma de anillo, no membranosas, de tamaño heterogéneo, en fibras de ratones delACAG que no estaban presentes en las fibras de ratones wt o dupA. Ultraestructuralmente, la mayoría de los gránulos estaban compuestos por una capa externa altamente electrodensa que rodeaba un material interno de aspecto variable (Fig. 30a).

Para corroborar si estos gránulos eran equivalentes a los identificados por microscopía confocal, se comparó el MFD de las estructuras detectadas por TEM (n=26), con el de los gránulos delACAG positivos para FXR1P observados por microscopía confocal (n=193). Este estudio reveló una distribución de longitud de diámetro similar en ambos casos, con una media de MFD de 0,51 μm para los gránulos visualizados por TEM y de 0,59 μm para los de microscopía confocal. Este dato, junto con el hecho de que los gránulos identificados por TEM también se encontraron frecuentemente próximos a mitocondrias, al igual que en microscopía confocal, sugería que estas estructuras correspondían a las isoformas musculares mutantes de FXR1P (Fig. 30b). No obstante, la comprobación definitiva se obtuvo a través de un experimento de inmunomarcaje contra FXR1P, usando un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro coloidal, en secciones ultrafinas de gastrocnemio de ratones delACAG y control. Este estudio inmunolocalizó la proteína FXR1P mutante en la capa electrodensa externa de los gránulos delACAG (Fig. 30c-d), confirmando así la verdadera naturaleza de esas estructuras. El análisis de inmunofluorescencia y TEM en fibras EDL de ratones heterocigotos delACAG también detectó este tipo de estructuras granulares, pero en un número mucho menor que en los homocigotos delACAG y localizadas prácticamente en su totalidad en las regiones más externas de las fibras (Fig. 27-30e). Tras este resultado, se examinó la ultraestructura de miotubos V-4 crecidos en portaobjetos de cultivo celular con cámara y diferenciados a partir de mioblastos primarios. El análisis de cortes ultrafinos de estas células por TEM, identificó estructuras granulares de apariencia y electrodensidad similar a las descritas para las fibras musculares de los ratones delACAG (Fig. 30f).

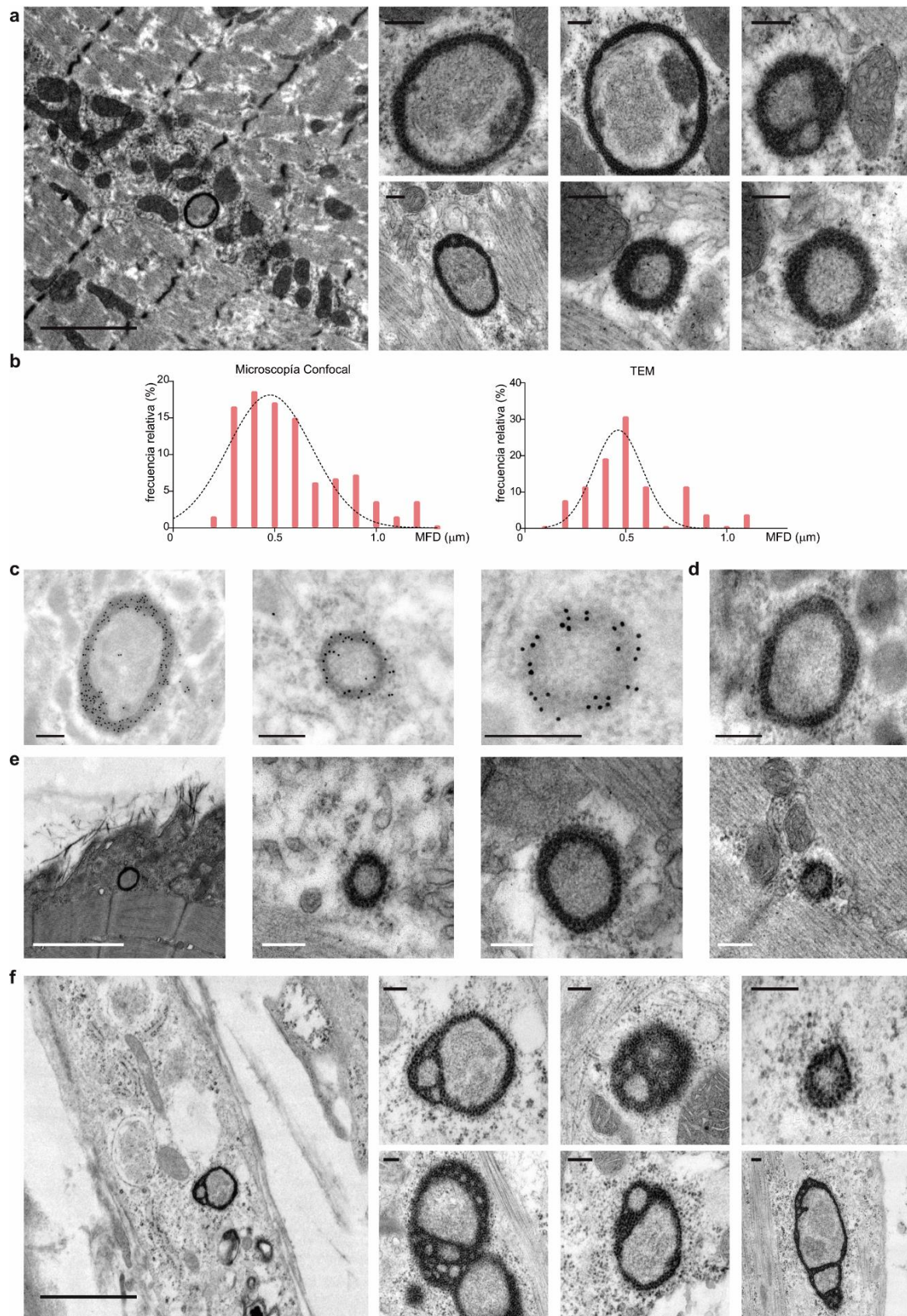


Figura 30. Evaluación ultraestructural de gránulos delACAG presentes en gastrocnemio de ratones delACAG o miotubos de V-4. a) Imágenes TEM representativas de gránulos de diferente tamaño observados, exclusivamente, en fibras de gastrocnemio de ratones delACAG. Los gránulos a menudo se encuentran cerca de las mitocondrias. n = 3 (wt), 4 (delACAG), 2 (dupA) ratones.

Barras de escala = 2 μ m (panel izquierdo), 200 nm (resto de paneles). b) Determinación cuantitativa del tamaño de los gránulos detectados por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal (CF) contra FXR1P (histograma izquierdo) y por TEM (histograma derecho) en fibras de ratones delACAG. La frecuencia relativa de los gránulos dentro de un rango de longitud específica (intervalo de 0.1 μ m) de MFD (eje X) se representa en el eje Y. Número total de gránulos analizados: n = 193 (CF) y n = 26 (TEM). c) Immunolocalización de FXR1P utilizando un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro coloidal, en secciones ultrafinas de gastrocnemio de ratones delACAG, en las que se muestra la proteína FXR1P mutante en la capa electrodensa externa de los gránulos. n = 3. Barra de escala = 200 nm. d) Control negativo de la técnica, utilizando el mismo anticuerpo secundario unido a oro y secciones de fibras delACAG, pero sin primario, demostrando ausencia de marcaje en los gránulos delACAG. Barra de escala = 200 nm. e) Imágenes TEM representativas de gránulos observados en fibras de gastrocnemio de ratones heterocigotos wt/delACAG, n = 4 ratones. Barras de escala = 2 μ m (panel izquierdo), 200 nm (resto de paneles). f) Imágenes TEM representativas de gránulos en forma de anillo de miotubos diferenciados V-4. Se analizaron múltiples miotubos. Estas estructuras no estaban presentes en los miotubos diferenciados control. Barras de escala = 2 μ m (panel izquierdo), 200 nm (resto de paneles).

Los gránulos delACAG contienen ARNm-poliA

Teniendo en cuenta que las isoformas mutantes delACAG de FXR1P conservan todos los motivos de unión al ARN de la proteína wt, se investigó si podrían interactuar con transcritos de ARNm-poliA, a pesar de estar ensamblados en gránulos. Para ello, se realizó un estudio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en fibras de EDL de ratón y en miotubos diferenciados de V-4, usando una sonda oligo-(dT)₃₀ marcada con Cy3 en su extremo 5', seguido de inmunofluorescencia con anti-FXR1P. Se observó que una proporción de gránulos delACAG, en general los más voluminosos, presentaban un doble marcaje para la señal de FISH y la de anti-FXR1P. Por el contrario, no se obtuvo señal de FISH en el mismo tipo de fibras cuando se utilizó una sonda de secuencia diseñada al azar (scramble). Por tanto, este experimento sugiere la presencia de ARNm integrado en los gránulos delACAG (Fig. 31).

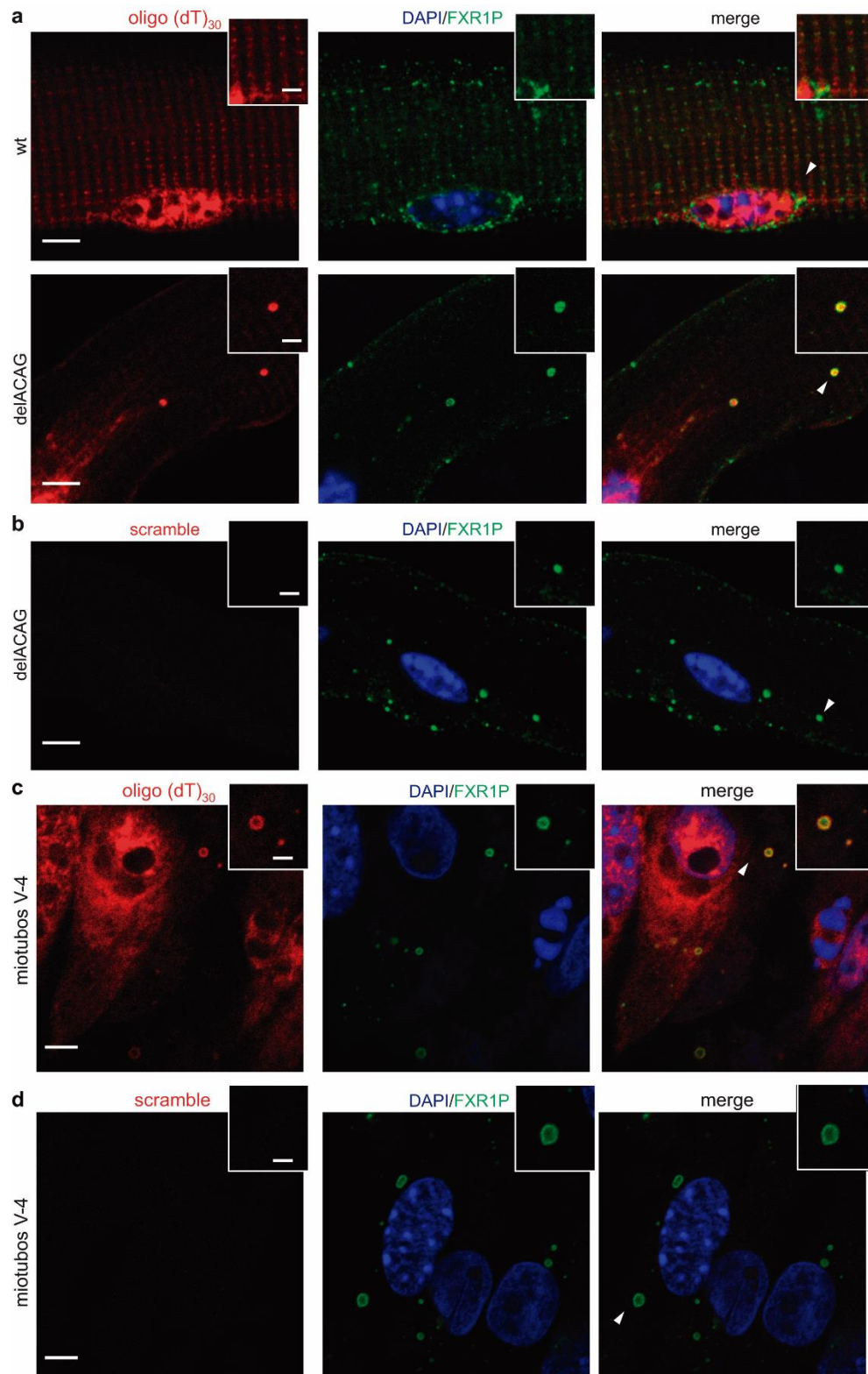
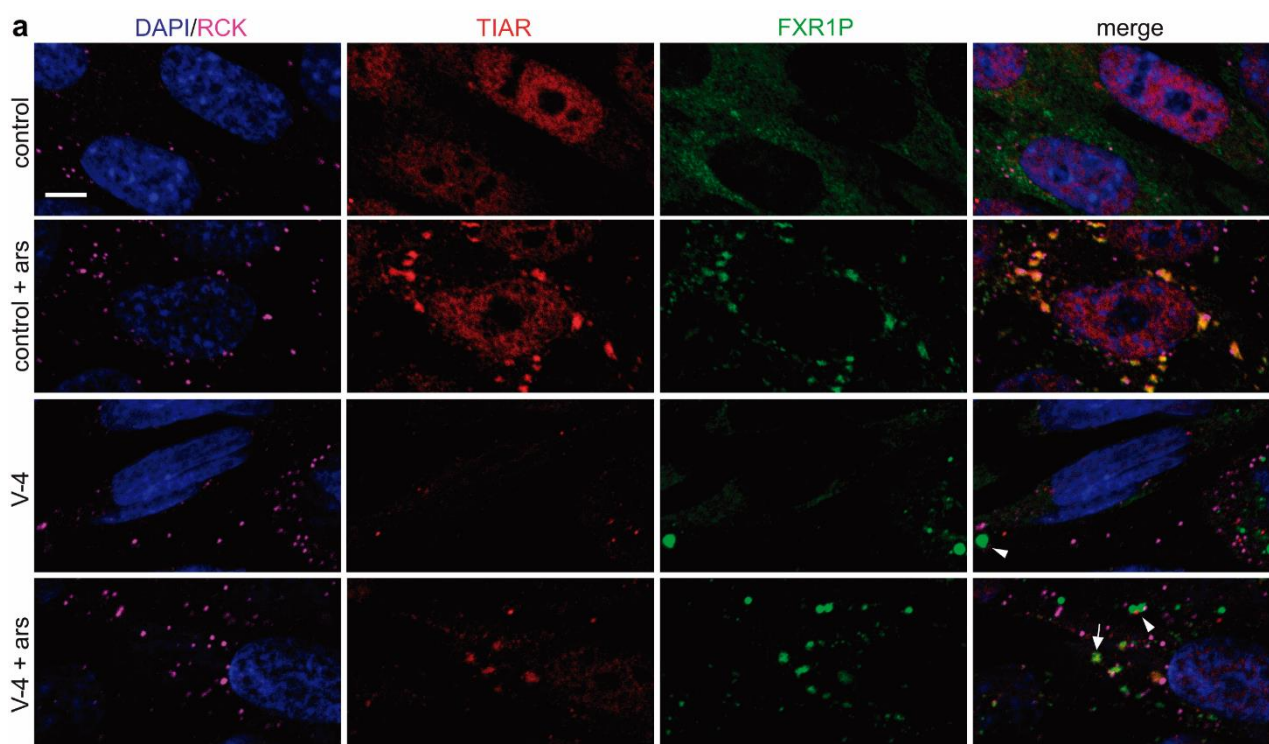


Figura 31. Los gránulos delACAG incorporan ARNm. Imágenes representativas de confocal (plano único) correspondientes a experimentos de FISH realizados en fibras aisladas de EDL de ratones de distinto genotipo (a y b) y en miotubos de V-4 (c y d), utilizando una sonda oligo(dT)₃₀ (a y c) o una sonda inespecífica (scramble, b y d) marcadas con Cy3 en el extremo 5', seguido de una inmunofluorescencia con anti-FXR1P (verde). Se observa señal positiva para el oligo(dT)₃₀ en gránulos delACAG. n = 7 ratones y n = 3 réplicas técnicas para miotubos de V-4. Las cabezas de flecha señalan la zona que se ha ampliado en el cuadro superior derecho. Barras de escala = 2 μ m. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

Los gránulos delACAG no son gránulos de estrés, ni forman parte de agresomas

FXR1P es un componente de gránulos de estrés (SG) (Mazroui et al., 2002). Estas estructuras son agregados de proteínas-ARN que se forman en respuesta al estrés celular, y cuya función es detener la traducción del ARNm que engloban (Anderson & Kedersha, 2008; Stoecklin & Kedersha, 2013). Para determinar si las acumulaciones de las isoformas delACAG podrían funcionar como gránulos de estrés (SG), se realizó, un estudio de co-inmunofluorescencia en mioblastos control y de V-4, usando anti-FXR1P y los marcadores de SG, TIAR y FXR2P (Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2002; Stoecklin & Kedersha, 2013). Para ello, los mioblastos fueron cultivados en medio de diferenciación por un día, con el fin de promover la expresión de las iso-e/f y posteriormente, se incubaron con arsenito (ARS) durante 45 minutos para inducir estrés, o se mantuvieron sin tratar. Este estudio demostró, superposición completa de la señal de FXR1P y la de los marcadores de SG en gránulos amorfos inducidos por ARS, correspondientes a SG, tanto en mioblastos control como del paciente. Sin embargo, en gránulos delACAG con forma característica de anillo la co-localización de la señal de los marcadores de SG y FXR1P fue nula (TIAR) o muy débil (FXR2P). Adicionalmente, se examinó si las partículas delACAG podrían tener relación con cuerpos de procesamiento (cuerpos-P), los cuales son un tipo diferente de agregados riboproteicos, implicados en la degradación de ARNm (Anderson & Kedersha, 2008; Stoecklin & Kedersha, 2013). Nuevamente, no se observó co-localización del inmunomarcaje de FXR1P con el del marcador de cuerpos-P, RCK (Wilczynska et al., 2005), en los gránulos delACAG con forma de anillo (Fig. 32).



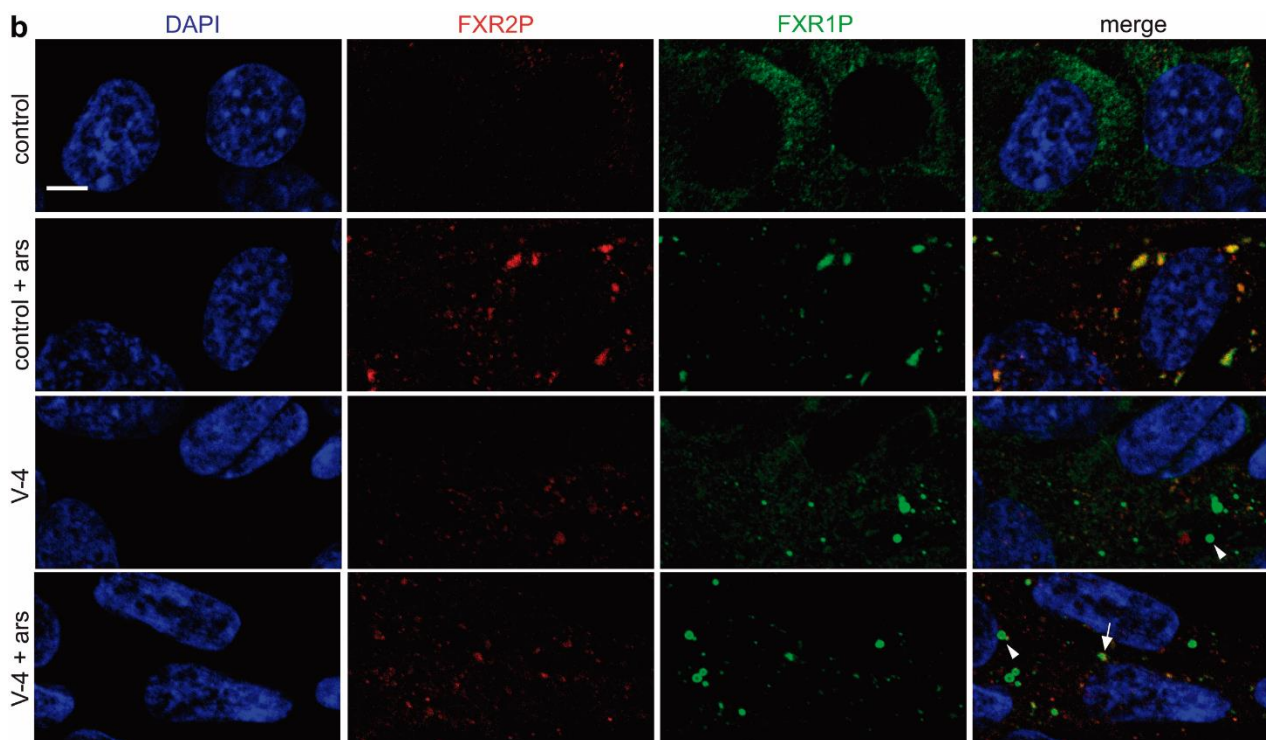


Figura 32. Los gránulos delACAG no reclutan componentes de SG. Imágenes representativas de microscopía confocal (plano único) de mioblastos control o de V-4 diferenciados un día, tratados con o sin ARS y, posteriormente, usados en co-inmunotinción para FXR1P (verde) y TIAR(rojo)/RCK(magenta) (a) o FXR2P(rojo) (b). En gránulos SG amorfos (flechas) se produce una fuerte co-localización de FXR1P con TIAR (a) o FXR2P (b), pero no en gránulos delACAG en forma de anillo (puntas de flecha). $n = 4$ (TIAR/RCK); 3 (FXR2P). Tampoco hay colocalización de los gránulos delACAG tipo anillo con el marcador de cuerpos-P, RCK (a). Barras de escala = 5 μm . Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Asimismo, se analizó si las acumulaciones proteicas en forma de anillo delACAG podrían corresponder a agresomas. Estas estructuras son acumulaciones de proteínas mal plegadas que se forman para proteger a la célula, cuando la vía de degradación mediada por ubiquitina-proteasoma está saturada, y cuya formación depende del transporte retrógrado de proteínas a lo largo de la red microtubular, así como de la histona desacetilasa HDAC6 (Chin et al., 2008; Salemi et al., 2014). Del mismo modo que en el caso de los SG, para este experimento se utilizaron mioblastos de V-4 y control diferenciados por un día y, a continuación, se incubaron con el inhibidor del proteasoma MG-132 durante 6 horas, o se mantuvieron sin tratar. Seguidamente, se llevó a cabo un estudio de co-inmulo-localización entre FXR1P y agresomas utilizando un kit especializado (PROTEOSTAT® Aggresome detection kit, Enzo). De nuevo no se obtuvo marcaje positivo para agresomas en los gránulos delACAG de tipo anillo. Además, se observó, que en las células miogénicas de V-4 con mayor número de gránulos delACAG, parecían formar menor cantidad de estos agresomas cuando se trataba el cultivo con MG-132, en comparación con el control, sugiriendo una posible alteración en la formación de estas estructuras como consecuencia de la mutación delACAG (Fig. 33).

En su conjunto, estos experimentos revelan que estas acumulaciones de proteína mutada, no funcionan como agregados de silenciamiento o degradación de ARNm, ni son acumulaciones proteicas mal plegadas producidas por bloqueo del proteasoma.

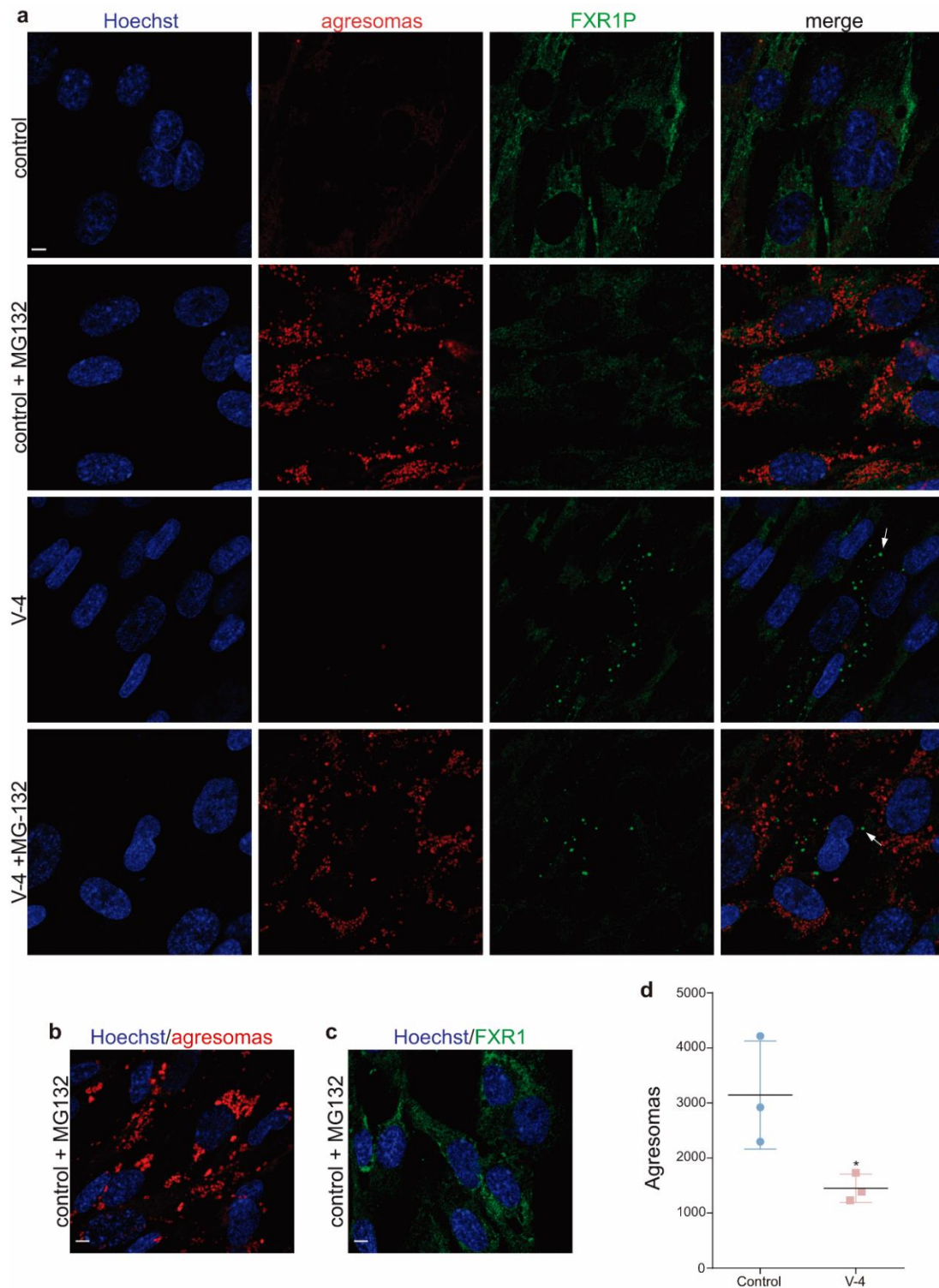


Figura 33. Los gránulos delACAG no son agresomas. a) Imágenes representativas de microscopía confocal (plano único) de mioblastos control o de V-4 diferenciados un día y tratados con o sin MG-132, seguido de la co-inmunotinción para FXR1P (verde) y agresomas (rojo). Se observa que no hay colocalización entre agresomas y gránulos delACAG tipo anillo (flecha). También se

puede apreciar una mayor formación de agresomas al tratar con el inhibidor del proteasoma en los mioblastos control en comparación con los de V-4, especialmente en aquellos con mayor número de gránulos anulares. $n = 3$. b-c) Controles negativos realizados con los mismos reactivos a excepción del anti-FXR1P (b) o el reactivo para detectar agresomas (c), para demostrar especificidad de las tinciones y ausencia de cruce de bandas de emisión. Barras de escala = 5 μm . Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. d) Cuantificación de intensidad de fluorescencia a través de los valores de “integrated density”, correspondientes a la tinción de agresomas utilizando imágenes obtenidas en a). Se realizaron 3 réplicas experimentales, analizándose un total de $n = 57$ mioblastos control y $n = 37$ mioblastos de V-4. Los datos se muestran como la media \pm SD analizados estadísticamente mediante una prueba de *t*-student de dos colas.

Las isoformas e/f mutantes se ensamblan en gránulos tipo anillo en células HeLa

Para averiguar si los gránulos del ACAG se pueden formar fuera de un entorno miogénico, se transfectaron de forma transitoria células HeLa con construcciones plasmídicas portadoras de la secuencia de la iso-e de FXR1P humana wt, o las versiones mutantes del ACAG, delA o dupA, todas ellas fusionadas a GFP en el extremo Nt (Fig. 34a). La correcta expresión de todas las proteínas de fusión fue validada mediante WB en HEK293T transfectadas usando anticuerpos que reconoce: todas las isoformas de FXR1P (Proteintech); solo las iso-e/f de FXR1P exclusivamente (#27-15 (Dubé et al., 2000)); o un anticuerpo anti-GFP. En este experimento se pudo observar que las tres versiones de la iso-e mutante se acumulaban principalmente en la IF del extracto proteico (Fig. 34b).

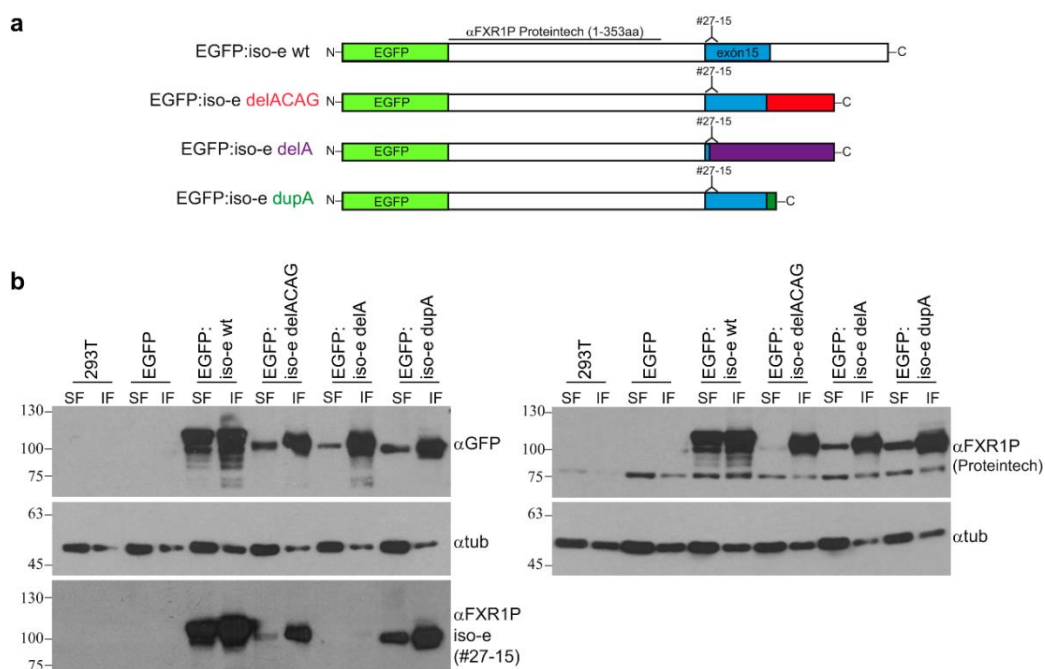
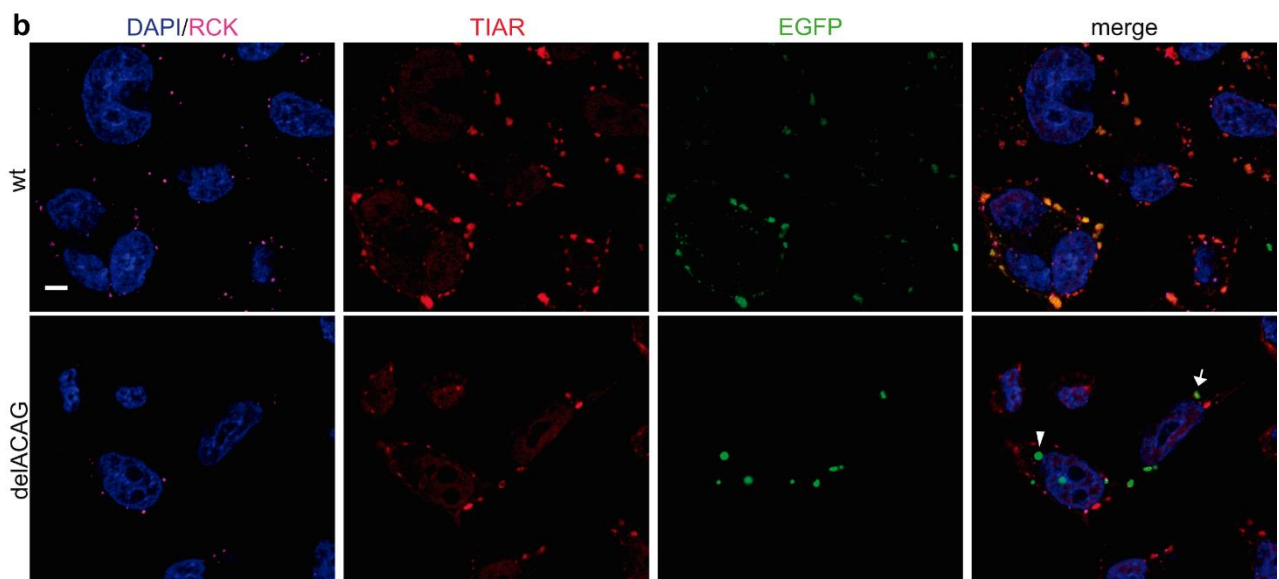
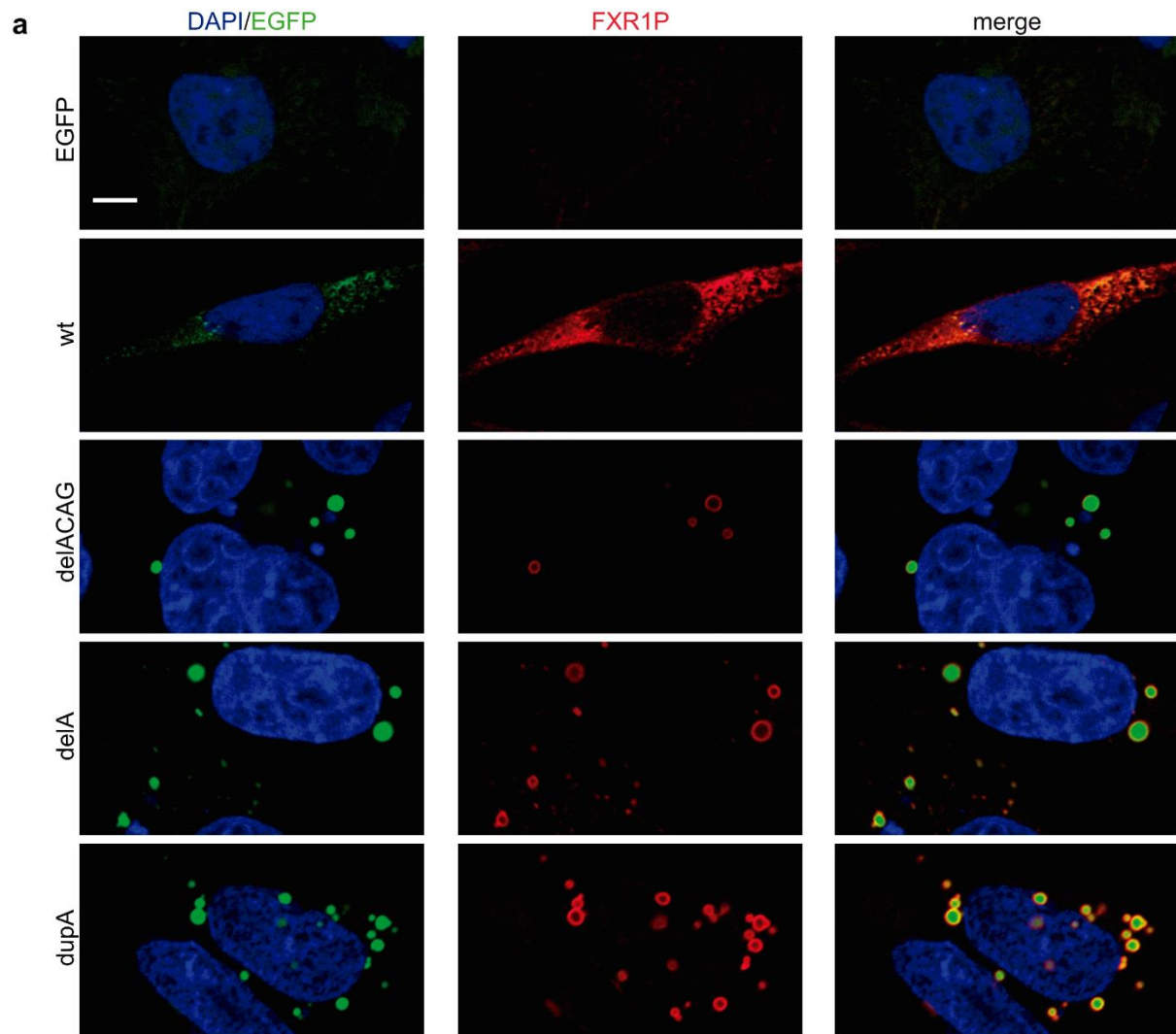


Figura 34. Proteínas de fusión EGFP::FXR1-iso-e. a) Representación esquemática de las proteínas de fusión EGFP::FXR1-iso-e humana wt y mutantes en las que se muestra el exón-15 (caja azul) y los diferentes extremos Ct de las proteínas mutantes según sus respectivas mutaciones. La posición del epítipo para los anticuerpos anti-FXR1P de Proteintech y # 27-15 está indicada. b) Inmunoblots representativos de extractos celulares de HEK293T (fracciones SF e IF), donde se demuestra la detección de las proteínas de fusión en células transfectadas con las construcciones EGFP::iso-e indicadas en a), pero no en células control transfectadas con el vector vacío pEGFP-C1 (EGFP), o en células no transfectadas (293T). El anticuerpo contra la región Nt de FXR1P (panel derecho,

Proteintech) y anti-GFP (panel izquierdo) identificaron bandas de igual tamaño. En la membrana anti-GFP, se inhibió la señal del anticuerpo secundario y reincubó con el anticuerpo específico del exón-15 de FXR1P (# 27-15), produciendo un resultado idéntico, excepto para EGFP::iso-e-delA (panel inferior izquierdo). Esto es debido a que la variante delA solo incluye los 5 primeros aminoácidos del péptido utilizado para generar #27-15 (Dubé et al., 2000), y no es reconocida por este anticuerpo. Por el contrario, todo el péptido inmunogénico de # 27-15 está presente en las isoformas delACAG y dupA (Figura 17c). α -tubulina (α tub) se usó como control de carga. n = 2.

Mediante inmunofluorescencia en las células HeLa transfectadas se comprobó, que la práctica totalidad de gránulos EGFP/FXR1P positivos, que se formaban con las distintas isoformas mutadas, presentaban una apariencia equivalente a los gránulos FXR1P-delACAG (Fig. 35a). Seguidamente, se estudió el grado de participación de la iso-e wt y las distintas variantes mutantes en SG y cuerpos-P en este sistema. Para ello, se analizó la expresión de EGFP y varios marcadores de estas estructuras (TIAR, RCK, FXR2P y FMR1P) en células HeLa transfectadas incubadas con o sin ARS. En las células no tratadas con ARS, la expresión de EGFP::iso-e wt se encontró diseminada por el citoplasma, si bien, se observó la existencia de una proporción variable de células estresadas, posiblemente debido a la transfección y/o sobreexpresión de elevados niveles de FXR1P, en las que también se detectó señal de EGFP::iso-e wt en SG. Esto concuerda con los datos obtenidos por Mazroui et al. 2002, donde la transfección y sobreexpresión de FMRP-iso1 en células STEK provocaba la acumulación de esta proteína en SG. En las células tratadas con ARS, la señal EGFP::iso-e wt se acumulaba en SG de morfología irregular. En el caso de células transfectadas con cualquiera de las variantes iso-e mutantes (delACAG, delA y dupA), independientemente del tratamiento con ARS, la señal EGFP::iso-e se detectó en gránulos citoplasmáticos tipo anillo similares a los delACAG, o alternatively como parte de SG de aspecto amorfo. En base al conjunto de estos experimentos se pudo concluir, que la acumulación de las variantes iso-e mutantes en gránulos tipo anillo no es dependiente de un ambiente miogénico, ni de la secuencia aminoacídica del extremo Ct presente en las proteínas mutadas (ver Ct en Fig. 17c). Además, los gránulos de tipo anillo en HeLa no son dependientes de estrés, ni exhibieron co-localización con TIAR, RCK o FMR1P (Fig. 35b-c), y solo algunos gránulos presentaron una co-localización débil con FXR2P (Fig. 35d).

Recientemente, se ha descrito que la fosforilación de la iso-a e iso-e de FXR1P tiende a bloquear (iso-a) o reducir (iso-e) la capacidad de estas isoformas de formar agregados de forma natural al ser portadoras de dominios de desorden intrínseco (IDD) en su extremo Ct (Smith et al., 2020). Para determinar si el estado de fosforilación de las variantes de iso-e mutantes estudiadas en esta tesis podría haber variado, se realizó una predicción bioinformática, utilizando el software NETphos 3.1 predictor, de los sitios de fosforilación del extremo Ct de las diferentes iso-e mutadas, comenzando a partir del primer aminoácido del exón 15. En todas ellas, se observó, una disminución del número de residuos potencialmente fosforilados en comparación con la iso-e wt, lo que podría favorecer la formación de dichos gránulos (Fig. 36).



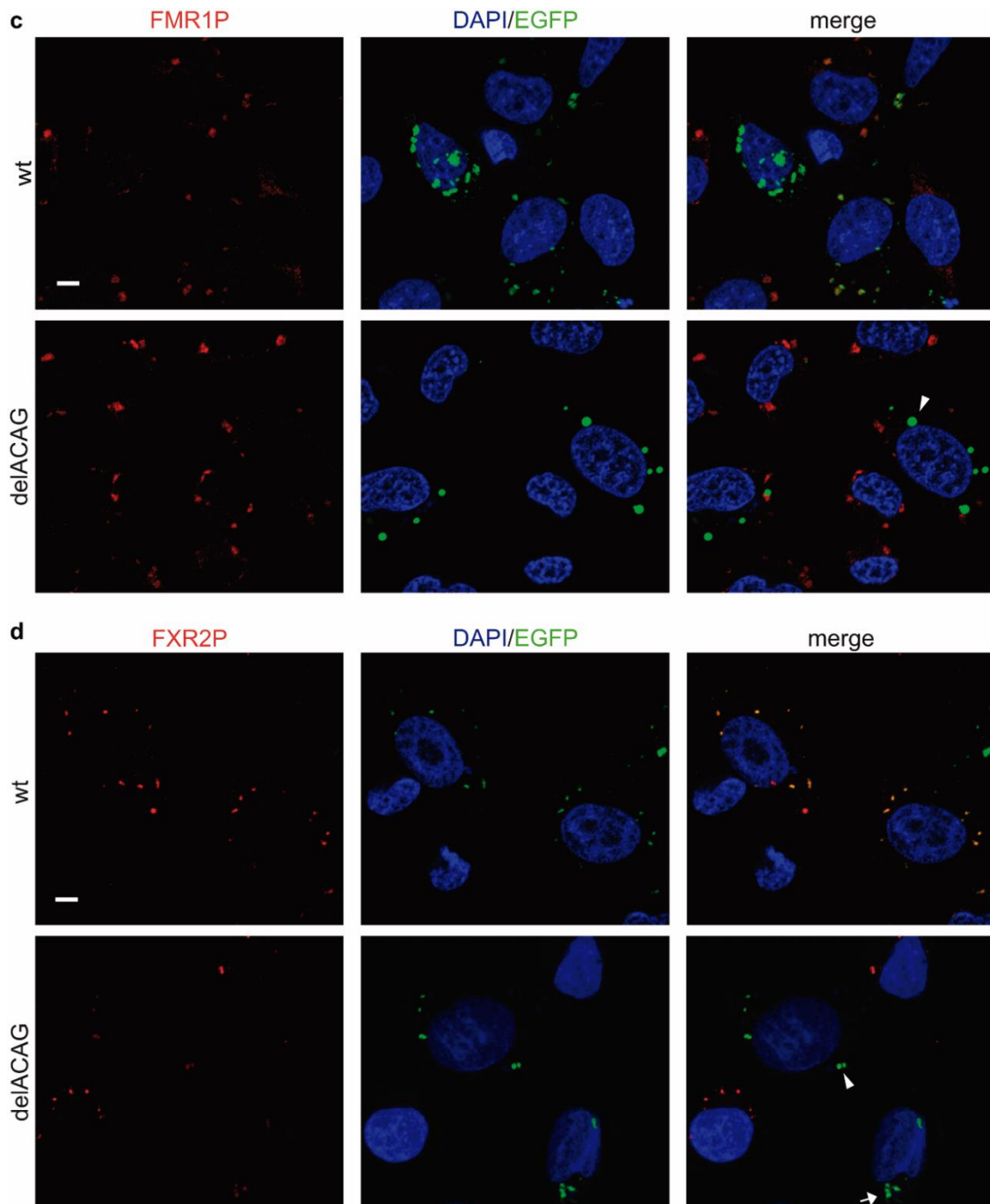


Figura 35. Las iso-e mutantes se ensamblan en gránulos tipo anillo en células HeLa, pero no son SG. a) Imagen representativa de microscopía confocal (plano único) para EGFP (verde) e inmunofluorescencia con anti-FXR1P (Proteintech) (rojo), correspondiente a células HeLa transfectadas con EGFP solo, o con diferentes construcciones EGFP::iso-e. Se observa que las células HeLa transfectadas con cualquiera de las iso-e mutadas forman gránulos de FXR1P en forma de anillo. $n = 3$. Barra de escala = 5 μm . b-d) Imágenes de microscopía confocal (plano único) de células HeLa transfectadas con la construcción EGFP::iso-e wt o delACAG, estresadas con arsenito (ARS) e inmunoteñidas frente a los marcadores de SG, TIAR (rojo) y RCK (magenta) en b), FMR1P (rojo) en c) y FXR2P (rojo) en d). La señal EGFP (verde) de EGFP::iso-e-wt como de EGFP::iso-e-delACAG colocaliza con la de TIAR/RCK (b), FMR1P (c) y FXR2P (d) en SG morfológicamente irregulares (flechas), pero no hay co-localización en gránulos delACAG con apariencia de anillo (b y c) o es muy débil (d) (puntas de flecha). Se obtuvieron resultados equivalentes en células HeLa transfectadas con las construcciones EGFP::iso-e-delA o -dupA. $n = 3$. Barras de escala = 5 μm . Los núcleos están marcados con DAPI.

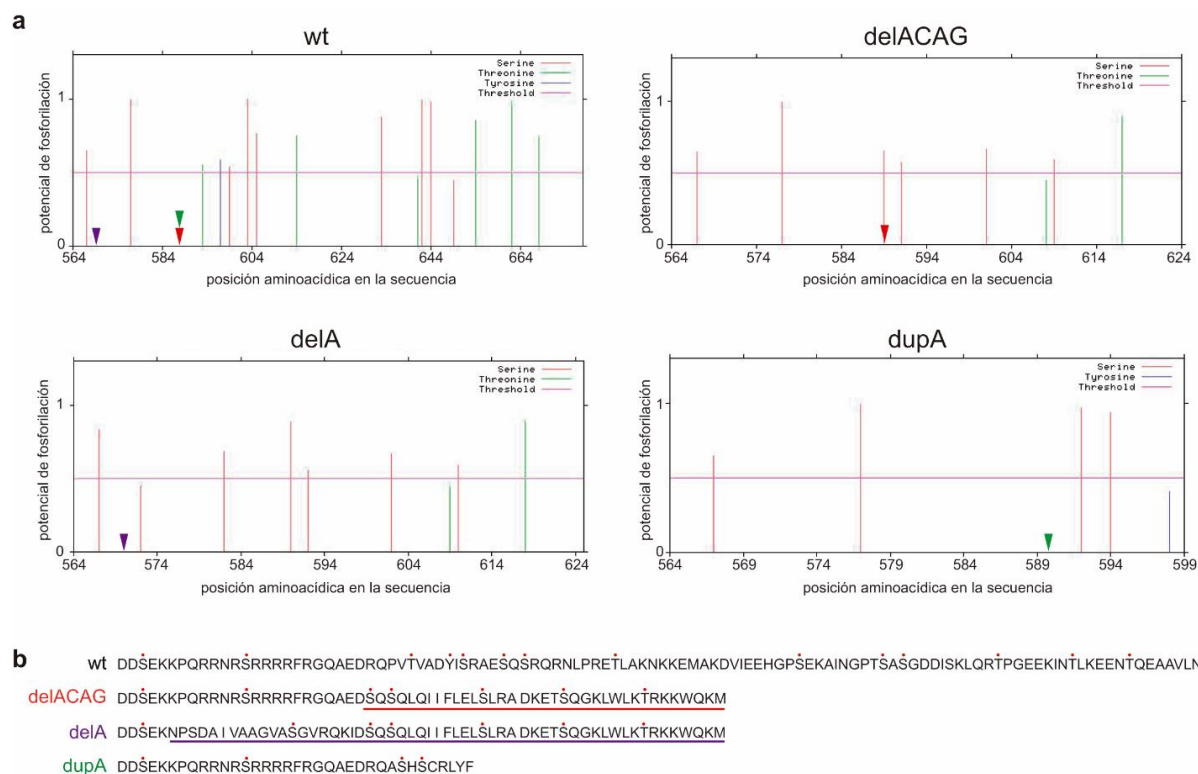


Figura 36. Variación en los residuos potencialmente fosforilados de las iso-e mutadas. a) Gráfica representativa correspondiente al análisis bioinformático de los posibles sitios de fosforilación del extremo Ct, a partir del primer aminoácido del exón 15, de la iso-e humana wt y las variantes delACAG, delA y dupA. Las mutaciones delACAG, delA y dupA están marcadas como una punta de flecha roja, morada y verde respectivamente. Se observa una disminución en el número de residuos potencialmente fosforilados en todas las iso-e mutadas con respecto a la wt. Las imágenes se obtuvieron utilizando el software NETPhos 3.1. b) Secuencia aminoacídica del extremo Ct, a partir del exón 15, de la iso-e humana wt, delACAG, delA y dupA, indicando con un punto rojo los residuos susceptibles de fosforilación según el software NETPhos 3.1. La parte de secuencia de las isoformas delACAG, delA y dupA, que difiere de la wt, está subrayada en rojo, morado y verde respectivamente.

Perfil de expresión del músculo esquelético en ratones CRISPR delACAG

Para investigar los procesos moleculares que se encuentran alterados en el músculo de ratones delACAG, se realizó un análisis comparativo de transcriptoma basado en la técnica RNA-seq, utilizando el ARN aislado de los músculos gastrocnemio + sóleo de ratones P15 delACAG y wt. Tras la normalización de los datos, se seleccionaron 233 genes expresados diferencialmente (DEG), de los cuales 150 estaban sobreexpresados y 83 subexpresados en los ratones mutantes con respecto a los wt. El análisis de enriquecimiento funcional de ontología génica (GO) identificó 25 anotaciones GO que incluyen: señalización de p53, transición del ciclo celular G1/S, respuesta al daño del ADN, apoptosis, desarrollo, diferenciación y contracción muscular, señalización de proteína quinasa B, potencial de acción y despolarización de membrana (Fig. 37 y tabla 6). Además, dentro de los DEG seleccionados, también se identificaron genes proinflamatorios. El análisis de enriquecimiento KEGG identificó la señalización de p53 como la vía estadísticamente más significativa (tabla 7).

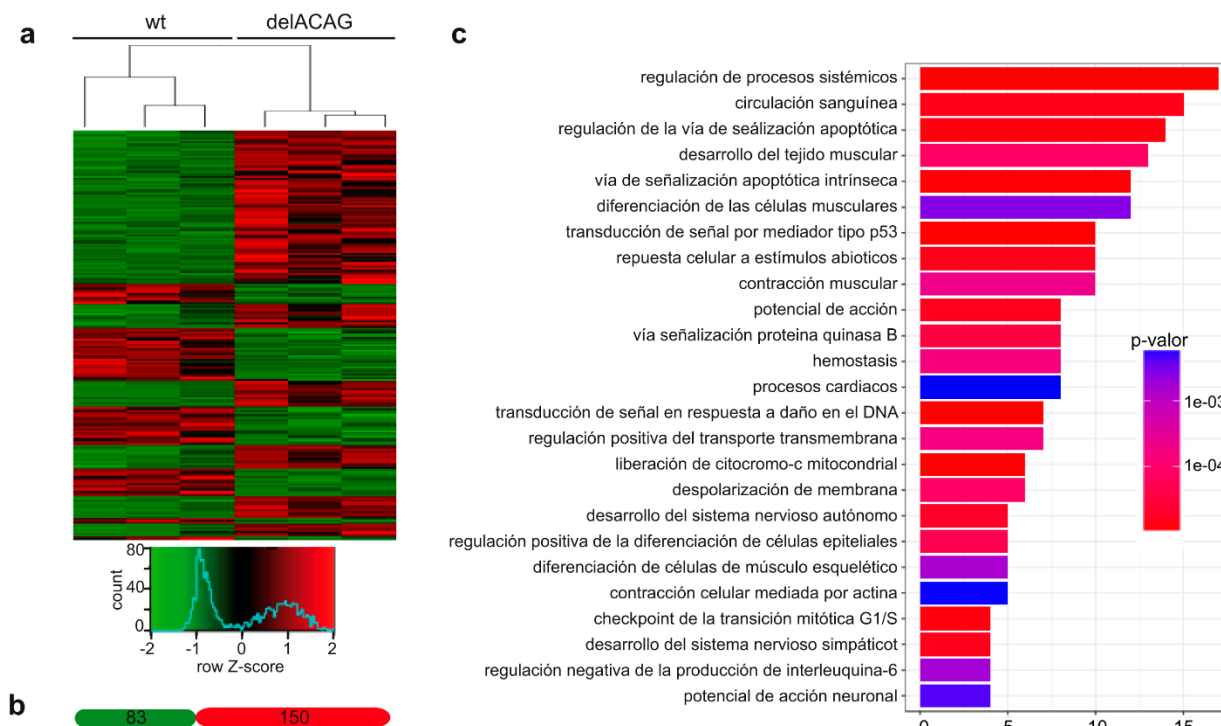


Figura 37. Perfil de expresión génica en músculo esquelético de mutantes delACAG. a) Agrupación jerárquica y visualización de mapa de calor de los genes expresados diferencialmente (DEG) seleccionados, resultantes del análisis mediante RNAseq, de muestras de ARN del músculo esquelético aisladas de 3 wt y 3 ratones delACAG de edad 15 días. b) Número de genes sobreexpresados (rojo) y subexpresados (verde) entre 233 DEG seleccionados. c) Análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO) que muestra vías y procesos biológicos sobrerrepresentados en los DEG seleccionados. El número de genes se muestra en el eje X (tabla 6).

Para verificar los resultados del RNA-seq, se llevó a cabo un análisis de RT-qPCR y/o WB de genes representativos, de diferentes grupos funcionales, utilizando muestras de gastrocnemio. En estos experimentos se incluyeron ratones dupA de la misma edad para realizar una comparación. En primer lugar, se examinó el grado de expresión de la familia de genes *p53/p63/p73* por RT-qPCR. Este análisis confirmó una inducción notable de los niveles de ARNm de *Trp73* (Incremento (FI): 54 ± 18 SD) y en menor grado de los de *Trp63* (FI: $6,8 \pm 2$ SD) en ratones delACAG (Fig. 38), pero, por el contrario, dos ensayos TaqMan diferentes no mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm de *Trp53* entre ratones delACAG y wt. Del mismo modo, se validó la regulación positiva en mutantes delACAG de los siguientes transcritos: i) los reguladores del ciclo celular *Cdkn1a* y *Rb1*, aunque este último no alcanzó significatividad estadística; ii) transcritos relacionados con genes proinflamatorios/proapoptóticos *Nfkb2*, *Eda2r*, *Bex1*, *Cxcl10*, *Wdr35* y receptores de señal TNF como *Tnfrsf22*, *Tnfrsf23*; iii) el factor de transcripción *Ankrd1*; y iv) la miosina embrionaria *Myh3* (Fig. 38). Mediante WB se confirmó un incremento en el tejido muscular de ratones delACAG de la expresión de la caspasa-3, la cual actúa como mediador de la apoptosis, si bien no se encontró variación estadísticamente significativa de los niveles de su forma activa entre ratones control y mutantes

(Fig. 39a y c). La sobreexpresión de CDKN1A y ANKRD1 también fue corroborada por WB (Fig. 39a y c). v) Asimismo, se verificó que los transcritos de dos genes implicados en la contracción muscular, *Slh* (FI: 106 ± 19 SD) y *Nos1* (disminución: $0,1 \pm 0,025$ SD), estaban significativamente incrementados o reducidos, respectivamente, en los ratones delACAG (Fig. 38). El aumento de los niveles de proteína SLN en el músculo sóleo y gastrocnemio de ratones delACAG en comparación con ratones wt (Fig. 39b y c) y los de triadina (TRDN), que, al igual que SLN, está involucrada en la homeostasis del Ca^{2+} se confirmó mediante WB (Fig. 39b y c). Del mismo modo, se verificó que los músculos delACAG tenían una mayor expresión de la mioquina *Gdf15*, relacionada con el estrés y un indicador de caquexia (Ahmed et al., 2021), y niveles menores del ARNm de miostatina (*Mstn*), una miocina inhibidora del crecimiento muscular (Fig. 38). En general, los ensayos de RT-qPCR y WB en ratones delACAG proporcionaron resultados acordes con los obtenidos por RNA-seq. El análisis mediante RT-qPCR de mutantes dupA, reveló un patrón de cambios en la expresión génica similar al de los ratones delACAG, aunque, para la mayoría de los genes, el alcance de estos cambios fue considerablemente menor o no fue estadísticamente significativo (Fig. 38). Finalmente, se cuantificó la cantidad de ARN de *Terc* en el tejido muscular de ambos mutantes del exón 15 por RT-qPCR, ya que estudios previamente publicados habían mostrado que el ARN de *Terc* es estabilizado a través de FXR1P (Majumder et al., 2016a), y este gen no estaba incluido en el análisis por RNA-seq debido a que carece de cola poli-A. No obstante, no se detectaron diferencias significativas en la expresión muscular de *Terc* entre ratones control y mutantes (Fig. 38).

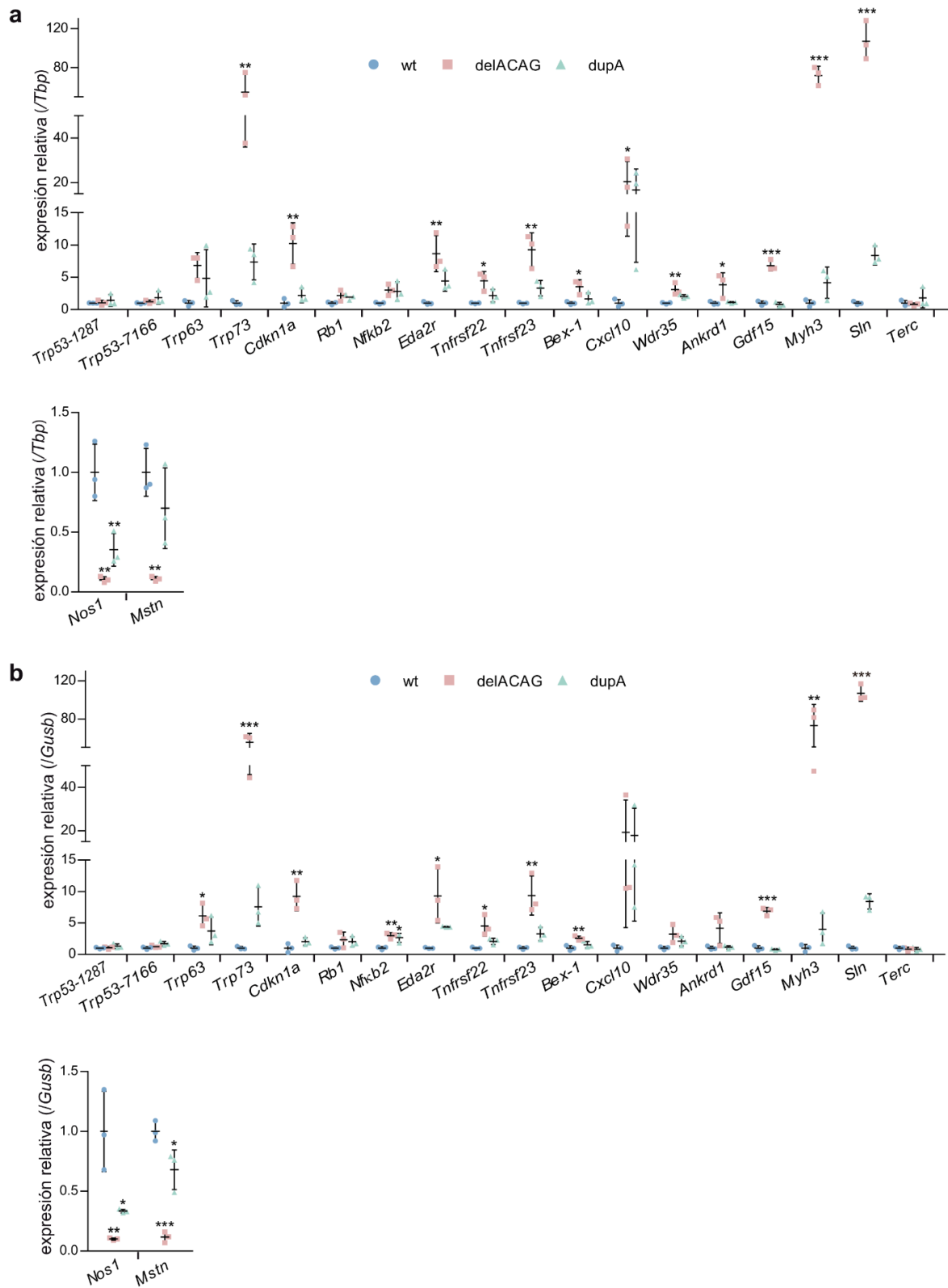


Figura 38. Estudio de expresión mediante RT-qPCR de genes candidatos identificados por RNaseq con expresión diferencial en músculo esquelético de ratones mutantes del exón 15 de *Fxr1*. Expresión relativa de los genes indicados obtenido por RT-qPCR en ARN de gastrocnemio de ratones de 1,5 meses de edad. Los valores están referidos a la expresión de *Tbp* (a) o *Gusb* (b) y se representan como variación con respecto al valor medio de los ratones wt. Las gráficas representan las medias \pm SD realizando un análisis estadístico ANOVA (**) de una vía con la prueba post-test de Tukey para comparar entre grupos. n = 3.

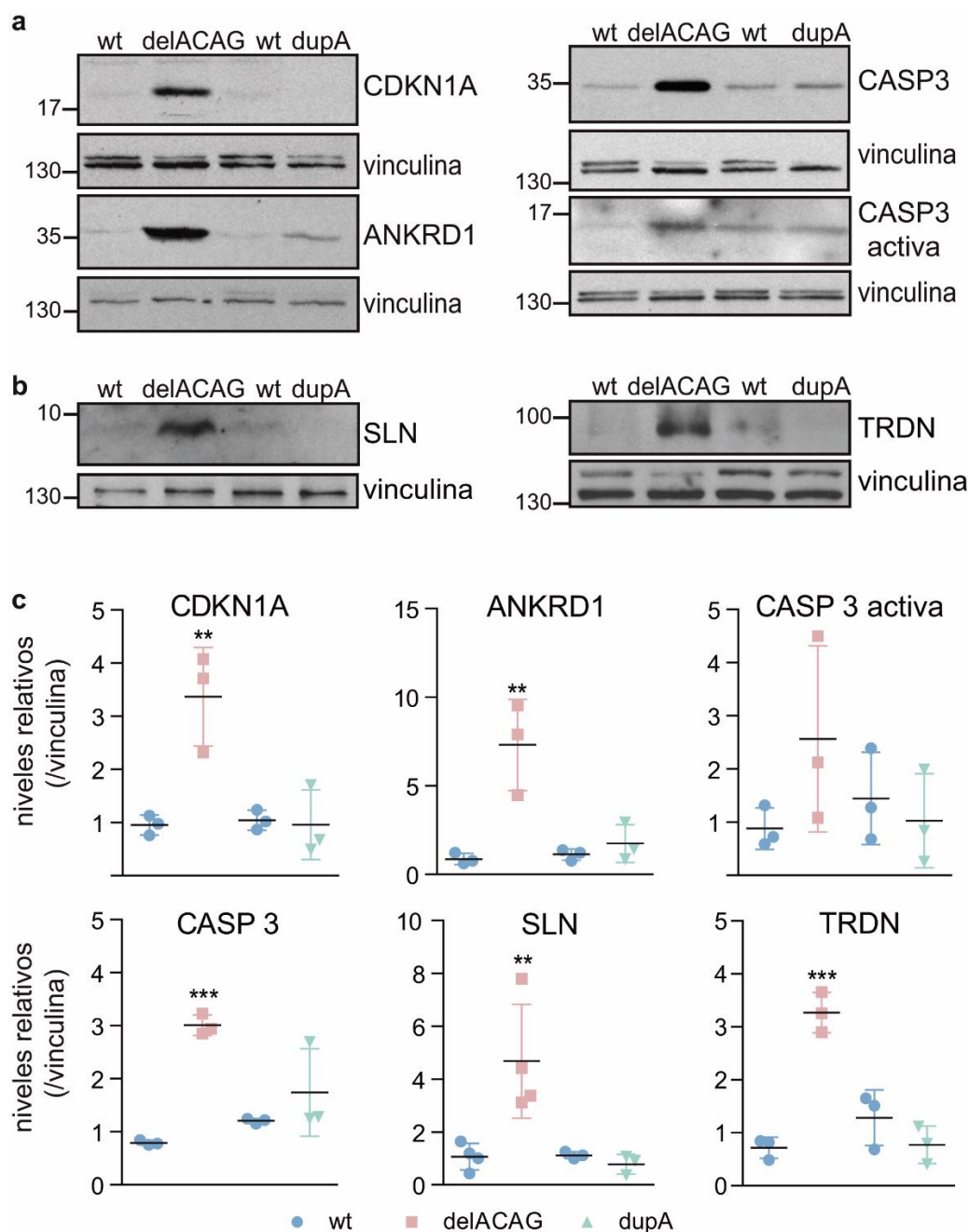


Figura 39. Análisis de niveles de expresión proteica de genes candidatos identificados por RNAseq con expresión diferencial en músculo esquelético de ratones mutantes del exón 15 de *Fxr1*. a) Inmunoblots representativos que muestran los niveles de CDKN1A, ANKRD1, CASP3 y CASP3-activa en gastrocnemio de ratones delACAG y dupA de 2- 3 meses de edad y sus correspondientes controles wt de la misma camada. b) Inmunoblots representativos para SLN y TRDN en extractos proteicos del sóleo (SLN) o gastrocnemio (TRDN) de ratones delACAG, dupA y wt de 2- 3 meses que demuestran mayor expresión de ambas proteínas en mutantes delACAG. c) Cuantificación por densitometría de los niveles de proteína CDKN1A, ANKRD1, CASP3, CASP3-activa, SLN y TRDN en gastrocnemio (o sóleo en el caso de SLN) de ratones delACAG, dupA y sus correspondientes controles wt de la misma camada. Para cada inmunoblot, los valores densitométricos fueron referidos al valor de vinculina (control de carga) y, a continuación, se normalizaron por el valor medio del número total de ratones wt analizados dentro del mismo inmunoblot. Los datos representan con la media \pm SD realizando un análisis estadístico ANOVA de una vía con un Tukey post-test para comparar entre grupos. Para todas las proteínas, n = 6 (wt), 3 (delACAG), 3 (dupA) ratones excepto para SLN n = 7 (wt), 4 (delACAG), 3 (dupA) ratones.

Capítulo 2: Mutaciones bialélicas en *MAPKAPK5* causan una alteración del desarrollo caracterizada por anomalías neurológicas, cardíacas y faciales junto con simpolidactilia

Evaluación clínica y estudios genéticos iniciales

La evaluación clínica de la familia 3, que se describe a continuación, fue realizada por el equipo de las Profesoras Mona Aglan, Samia Temtamy y la Dra. Ghada A. Otafy en el Centro de Excelencia para la Genética Humana, El Cairo, Egipto.

La probando de la familia 3, (II-3, Fig.40) es una niña nacida de una pareja egipcia consanguínea (primos hermanos) sana, con un historial familiar de hijos previos fallecidos (Fig. 40). Durante el embarazo de la probando, la ecografía fetal indicó retraso del crecimiento intrauterino y, a los 6 meses de gestación, se detectó Tetralogía de Fallot (TF) mediante ecocardiografía. La niña nació por cesárea (CS) a las 40 semanas de gestación con una longitud y perímetro cefálico occipitofrontal normal, pero con bajo peso. Se realizó una corrección total del defecto cardíaco a los 8 meses. Mediante un nuevo examen a la edad de 1 año, se observó dolicocefalia, frente ancha, cabello escaso, fisuras palpebrales estrechas, esclerótica azul tenue, raíz nasal deprimida, labios finos, premaxila prominente y retromicrognatia (Fig. 41a). También se observó un tórax largo y estrecho con pectus carinatum y ausencia de la capacidad de mantenerse sentada. El examen de las extremidades reveló pulgares insertados proximalmente y dedos afilados, con sindactilia parcial entre el cuarto y quinto dedo y hoyuelos en la base de los dedos (Fig. 41c-d). El pie derecho presentaba un dedo extra corto entre el cuarto y quinto dígito y el quinto dedo del pie izquierdo era ancho y corto, con doble uña. También se observó sindactilia entre los dedos 4º y 5º del pie izquierdo. (Fig. 41f). El examen radiológico de manos y pies reveló duplicación de las falanges media y terminal del quinto dedo derecho y duplicación de la falange terminal del quinto dedo izquierdo con los primeros metacarpianos cortos bilateralmente. En el pie derecho se detectó un metatarsiano hipoplásico y una falange extra entre el cuarto y quinto dedo y en el pie izquierdo duplicación de falange media y terminal del quinto dedo (Fig. 41e,g). La valoración oftalmológica, incluida la exploración del fondo de ojo, reveló palidez de los discos ópticos y la retina de ambos ojos con fondo de ojo teselado. Los potenciales evocados visuales (PEV) mostraron una disfunción leve de la vía visual posterior y se observó pérdida moderada de la audición en el rango de alta frecuencia identificado por la respuesta auditiva del tronco encefálico (BAER). El seguimiento a la edad de 9 años reveló un retraso global del desarrollo; la niña no podía permanecer de pie sin apoyo y solo pronunciaba una palabra. El estudio de MRI y TC mostraron anomalías cerebrales con un cuerpo calloso delgado y el cuarto ventrículo dilatado con comunicación con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fig. 41h-i).

La familia tuvo otra hija afectada (II-5, Fig. 40), nacida prematuramente a las 36 semanas de gestación con peso normal y longitud y OFC por debajo del percentil 5. En la evaluación clínica se observó estrechamiento bitemporal, frente prominente, cejas dispersas, fisuras palpebrales estrechas, esclerótica azul, punta nasal

prominente, microrretrognatia, orejas con pocos pliegues de implantación baja y dedos superpuestos con uñas hipoplásicas (Fig. 41b). La valoración oftalmológica fue normal aparte del nistagmo. La ecocardiografía mostró una persistencia del conducto arterioso (CAP) y comunicación interauricular (CIA). Mediante MRI del cerebro a la edad de 18 meses se observó una dilatación asimétrica de los ventrículos laterales con mayor dilatación en el lado izquierdo, cuerpo calloso arqueado delgado y cuarto ventrículo en comunicación con LCR extraaxial (Fig. 41j-k). El electroencefalograma (EEG) mostró un patrón alterado y las convulsiones en la paciente fueron controladas con fenobarbital. La ecografía abdominopélvica mostró hidroureteronefrosis derecha y el cistoureterograma miccional reveló evidencia de reflujo vesicoureteral derecho significativo grado-V. La TC cerebral se repitió a los 1,5 años de edad y mostró ventrículos supra- e infratentoriales dilatados sin permeación del LCR y el borramiento del surco cortical, los cuales son propios de hidrocefalia. A la edad de 2 años y 7 meses, la niña presentaba un grave retraso generalizado, sin desarrollo del habla. El cariotipo de las dos niñas afectadas fue normal (46, XX) y mediante FISH no se detectaron alteraciones (deleción o translocación) en la región crítica del síndrome de DiGeorge y Velocardiofacial (DG / VCF) 22q11.2. Estos estudios genéticos iniciales también fueron realizados en el Centro de Excelencia para de Genética Humana de El Cairo. Las características clínicas de las dos pacientes (II-3 y II-5) de la familia 3, incluidas las medidas antropométricas, se resumen en la Tabla 8 y figura 41.

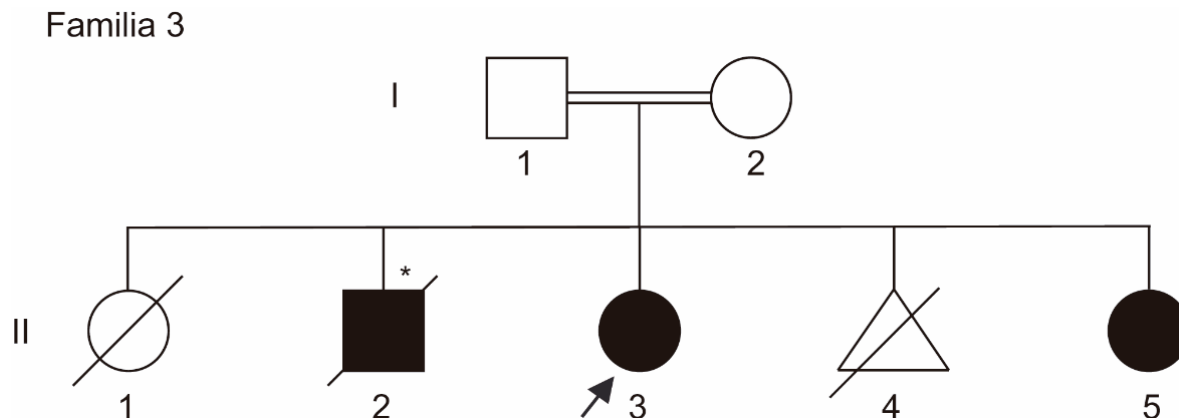


Figura 40. Pedigrí de la familia 3. La probando se indica con una flecha. El asterisco en II-2 indica que este niño falleció después del nacimiento debido a dificultad respiratoria y cardiomegalia. Sin embargo, debido a la falta de disponibilidad de ADN, no se pudo determinar si estaba afectado por la misma condición.

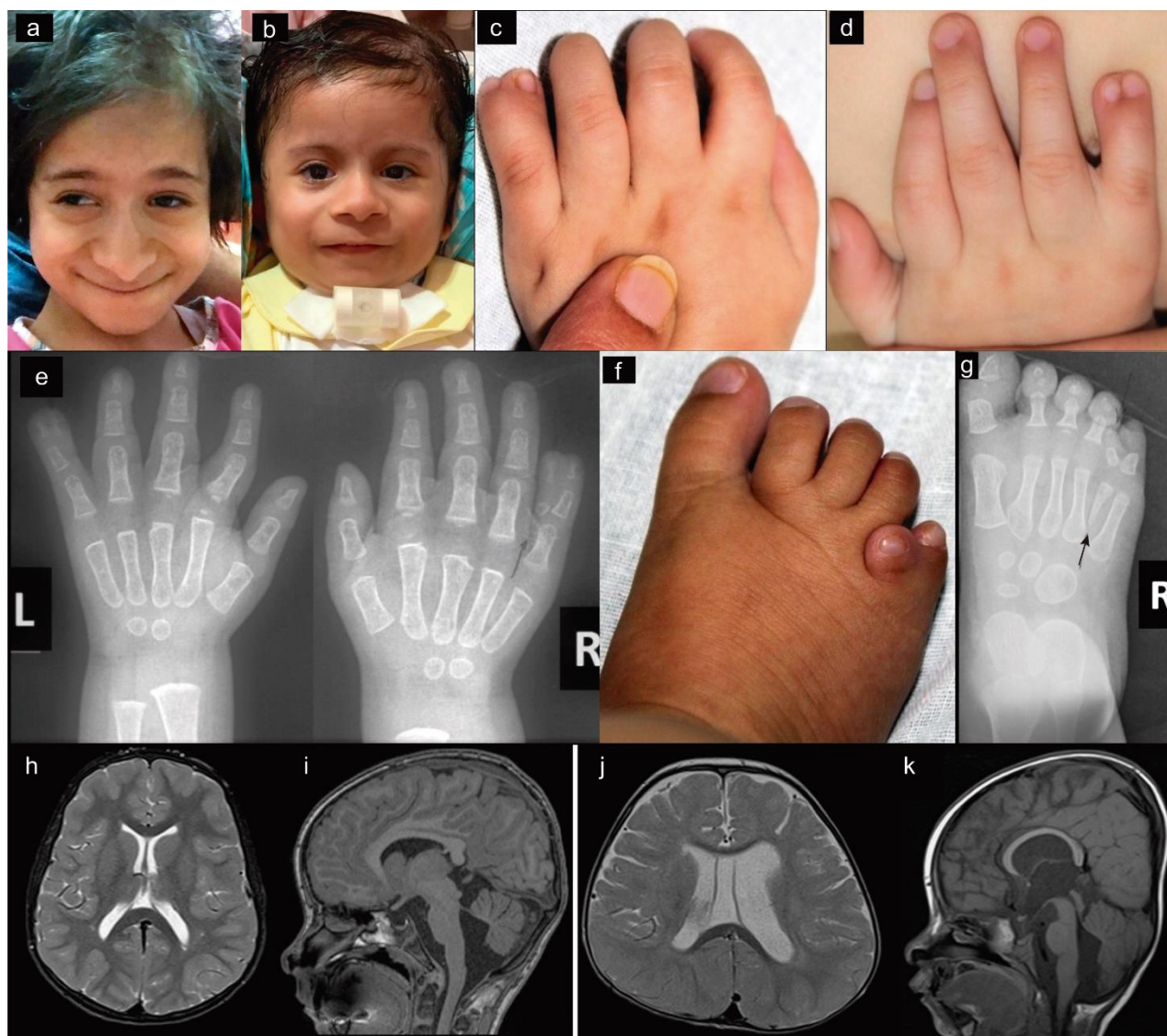


Figura 41. Figura 47. Características clínicas de las pacientes de la familia 3 con variantes patogénicas bialélicas en *MAPKAPK5*. a) Imagen clínica de la niña afectada II-3, a los 9 años. Se observa estrechamiento bitemporal, cara alargada, punta nasal sobresaliente y labios finos. b) Características faciales de la afectada II-5, a los 2 años de edad, con estrechamiento bitemporal, frente prominente, cejas ralas, punta nasal prominente, narinas anchas, labios finos y microrretrognatia. c-d) Mano izquierda (c) y derecha (d) de II-3 con uña doble bilateral del meñique y sindactilia cutánea parcial entre el 4º dedo y 5º dedo. e) Radiografía de las manos de II-3 en la que se observa duplicación de la falange terminal del meñique izquierdo y duplicación de las falanges media y terminal del meñique derecho con los primeros metacarpianos cortos bilateralmente. f) Imagen del pie derecho de II-3 mostrando un surco profundo entre los dedos 1º y 2º y un dedo extra corto entre el 4º y el 5º dedo. g) Radiografía del pie derecho de la paciente II-3, donde se aprecia un hueso metatarsiano extra hipoplásico (flecha) y una falange extra entre el 4º y 5º dedo del pie derecho, ausencia de falanges media y terminal del 5º dedo y falanges hipoplásicas media y terminal del 2º, 3º y 4º dedo h-i) Resonancia magnética del cerebro de II-3 a los 9 años. h: corte axial que muestra una leve desmielinización alrededor del cuerno occipital de los ventrículos laterales. i: corte sagital que muestra delgadez del cuerpo calloso, folia cerebelosa prominente e hipoplasia vermiana. El cuarto ventrículo se comunica con el líquido cefalorraquídeo (LCR). j-k) Resonancia magnética cerebral de II-5 a los 18 meses. j: corte axial que muestra cavum septum pellucidum, dilatación asimétrica de los ventrículos laterales con más dilatación en el lado izquierdo. k: corte sagital que muestra un cuerpo calloso arqueado delgado, folia cerebelosa prominente e hipoplasia vermiana leve. El cuarto ventrículo se comunica con el LCR.

Variantes de bialélicas de pérdida de función en *MAPKAPK5* causan múltiples anomalías congénitas

Al igual que en el caso la familia 1 con mutación en *FXR1*, el análisis molecular en la familia 3 comprendió la identificación de regiones cromosómicas de homocigosidad en las dos niñas afectadas, II-3 y II-5, mediante hibridación de ADN genómico en arrays de SNPs de genoma completo, junto con WES de la probando II-3. En base a la consanguinidad parental, se priorizaron variantes homocigóticas contenidas dentro de bloques de homocigosidad superiores a 1,5 MB compartidos por las dos hermanas. Este estudio identificó una duplicación homocigótica de 2 pb en el exón 4 de *MAPKAPK5* (GeneBank NM_139078.3:c.207_208dupTG; chr12 [GRCh37] g.112305396_112305397dup) que predeciblemente conduce a un desplazamiento de marco de lectura y la generación de un PTC después de siete tripletes; NP_620777.1:p(Ala70Valfs*7) (Fig. 42a). Esta variante no se encontró documentada en la base de datos de variantes genómicas gnomAD (v2.1.1) (Karczewski et al., 2020). Seguidamente, se confirmó por secuenciación Sanger la presencia del cambio c.207_208dupTG en homocigosis en la probando y su hermana afectada, mientras que ambos padres no afectados portaban esta variante en heterocigosis (Fig. 42b). La variante *MAPKAPK5* estaba contenida dentro de un bloque homocigótico de 20,38 MB [chr12 [GRCh37]:99285292-119670445] en II-3 y 23,74 MB [chr12: 95931697-119674690] en II-5. A través de la plataforma GeneMatcher, se inició una colaboración con el equipo de los Drs. Denise Horn y Felix Boschann (Instituto de Genética Médica y Humana, Berlín), quienes habían identificado una duplicación homocigótica de 1 pb NM_139078.3:c.1077dupT en el exón 11 de *MAPKAPK5* (chr12 [GRCh37]g.112326399dupT), en un niño de 19 meses de edad con características clínicas similares a las observadas en las pacientes de la familia 3 (Tabla 8) (Horn et al., 2021). El efecto proteico de esta variante NM_139078.3:c.1077dupT también tienen como consecuencia un desplazamiento de marco de lectura y una parada prematura de la traducción NP_620777.1:p.(Leu360Serfs*21) (Fig. 42a). Según la teoría del NMD, el ARNm de ambas variantes (p.(Ala70Valfs*7) y p.(Leu360Serfs*21)) estaría sometido a degradación por la vía de NMD.

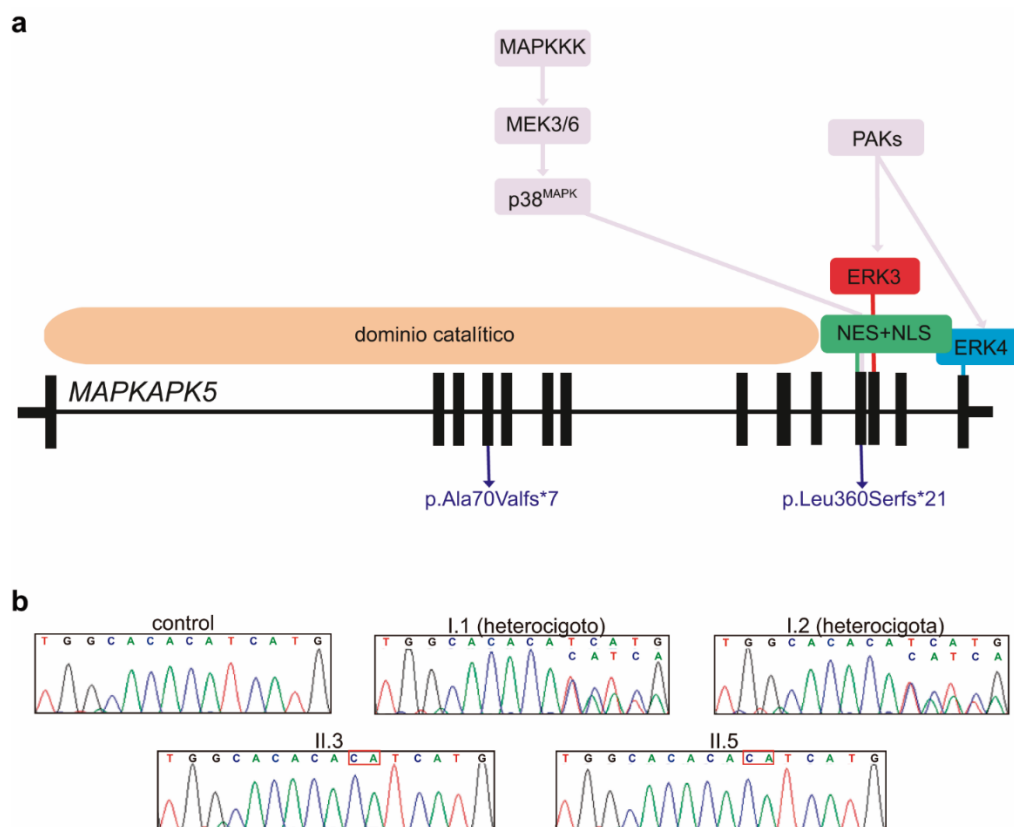


Figura 42. Descripción de las variantes identificadas en *MAPKAPK5*. a) Representación esquemática de la estructura del gen *MAPKAPK5* que ilustra la ubicación de las variantes identificadas en los individuos afectados. También se indican los dominios funcionales de MK5 y los sitios de unión con sus principales proteínas activadoras según Moens and Kostenko 2013. NES: señal de exportación nuclear. NLS: señal de localización nuclear. b) Cromatogramas de secuenciación de ADN (cadena inversa) demostrando una duplicación en homocigosis de dos nucleótidos (cuadro rojo) en el exón 4 de *MAPKAPK5* en la probando II-3, y en la hermana afectada II-5, que se encuentra en heterocigosis en sus padres (I-1 e I-2). También se muestra la secuencia de un control normal

La ausencia de isoformas de MK5 origina niveles reducidos de ERK3

Con el objetivo de determinar el efecto de la mutación identificada en la familia 3 sobre la proteína, se cultivaron fibroblastos a partir de una biopsia de piel de la probando II-3 de esta familia, y se analizó la expresión de *MAPKAPK5*, tanto a nivel de ARNm mediante RT-qPCR como de proteína por WB. El análisis de RT-qPCR de *MAPKAPK5*, el cual se llevó a cabo usando dos sondas Taqman diferentes, reveló una reducción del 40% de los niveles de ARNm de este gen en los fibroblastos de la paciente, en comparación con las células control, indicando que una proporción del transcrito mutante probablemente es degradado por NMD (Fig. 43a). Seguidamente, se analizó la expresión de los productos proteicos de *MAPKAPK5* (MK5) mediante WB. Este estudio detectó en las células de control una doble señal de 52-50 kDa correspondiente al peso molecular esperado de las dos isoformas de MK5 (NM_003668.3; NM_139078.2) y una isoforma más grande de 66 kDa, todas ellas ausentes en fibroblastos de II-3 (Fig. 43b). A día de hoy, se desconoce con certeza la naturaleza de la isoforma de 66 kDa, pero se ha descrito un patrón de isoformas de MK5 similar en ratones (Ronkina et al., 2015).

Dado que ERK3 interactúa con MK5, y estudios previos habían mostrado que la estabilidad de la proteína ERK3 depende de MK5 (Schumacher et al., 2004), se estudió la expresión de ERK3 a nivel de proteína en los cultivos de fibroblastos primarios humanos desprovistos de MK5. Este análisis reveló que los niveles proteicos de ERK3 se encontraban disminuidos en los fibroblastos de la probando de la familia 3, en comparación con las células control, indicando que la variante c.207_208dupTG no solo origina la pérdida de función de MK5, sino que también disminuye significativamente los niveles de la proteína ERK3 (Fig. 43b).

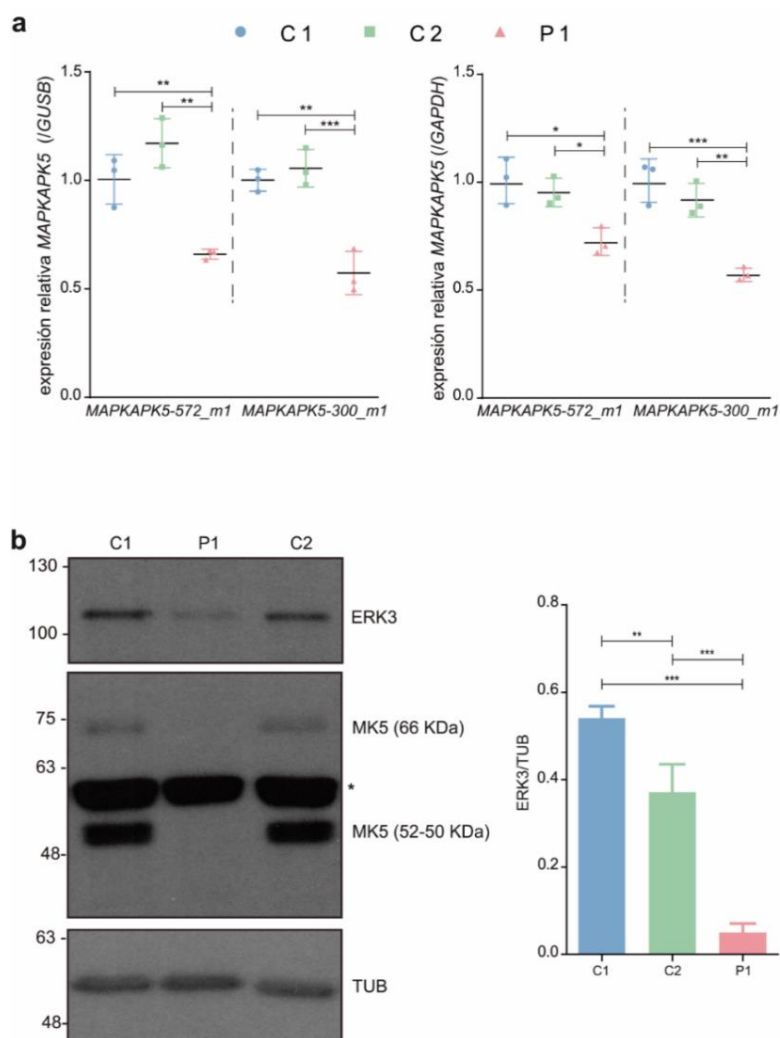


Figura 43. Cuantificación de los niveles de expresión de *MAPKAPK5* a nivel de ARNm y proteína en fibroblastos de la paciente II-3, de la familia 3, portadores de la mutación en MK5. a) Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de *MAPKAPK5* mediante RT-qPCR en fibroblastos de la paciente II-3 de la familia 3 (P1) y de controles (C1, C2). Se muestran los resultados de dos sondas Taqman específicas de *MAPKAPK5* distintas: *MAPKAPK5-572_m1* (*Hs00177572_m1*) y *MAPKAPK5-300_m1* (*Hs00934300_m1*), $n = 3$. b) Inmunoblot representativo con anti-MK5 y anti-ERK3 de fibroblastos control (C1 y C2) y de II-3, familia 3 (P1) ($n = 3$), demostrando ausencia de las isoformas de MK5 en las células de la paciente (doblete 52-50 kDa y 66 kDa). El asterisco en el inmunoblot designa una banda inespecífica. Tubulina (TUB) se usó como control de carga de proteínas. El gráfico de la derecha corresponde a la cuantificación relativa de los niveles de ERK3 calculada por densitometría. Para cada inmunoblot, los valores densitométricos de ERK3 se normalizaron frente a TUB ($n = 3$). Los gráficos representan la media \pm SD con un análisis estadístico mediante ANOVA de una vía con un Tukey post-test para comparar entre grupos.

Fibroblastos con mutaciones en *MAPKAPK5* presentan alteraciones en el proceso de remodelación de la actina

Previamente había sido descrito que MK5 regula la polimerización de los monómeros de actina (G-actina) en filamentos de actina (F-actina) (Tak et al., 2007). En base a esta premisa, se cultivaron fibroblastos primarios de la probando de la familia 3 y tres líneas de fibroblastos primarios control neonatales y adultos, se trataron con latrunculina-B durante 30 min para inducir la despolimerización de los filamentos de actina y, tras la eliminación de esta toxina, las células se mantuvieron en medio completo durante distintos tiempos, tras los cuales se analizó la recuperación del citoesqueleto de F-actina mediante tinción con Alexa Fluor 546-faloidina y microscopía de fluorescencia. En total, se realizaron $n \geq 4$ réplicas experimentales, observándose en todas ellas que cualitativamente la regeneración de F-actina era menos eficiente en los fibroblastos de la paciente II-3 que en las células de control (Fig. 44). Subsecuentemente, para cuantificar este proceso, se volvieron a cultivar los distintos tipos celulares con latrunculina-B durante 30 minutos, pasados los cuales se eliminó este compuesto y se mantuvo a las células en recuperación en medio de crecimiento durante otra media hora, antes de ser fijadas. A continuación, se realizó un doble marcaje de actina filamentosa (F-actina) y actina globular monomérica (G-actina) con Alexa Fluor 488-faloidina y de Alexa Fluor 594-DNasaI respectivamente, y se cuantificó la proporción de F-actina/G-actina en cada tipo celular por citofluorescencia, con la ayuda del parámetro “integrated density” normalizado o sin normalizar obtenido a través del análisis de imágenes de microscopía confocal (Fig. 45-46). El resultado de este estudio corroboró el defecto en la recuperación de filamentos de F-actina en los fibroblastos de la paciente II-3, de la familia 3, deficientes en MK5.

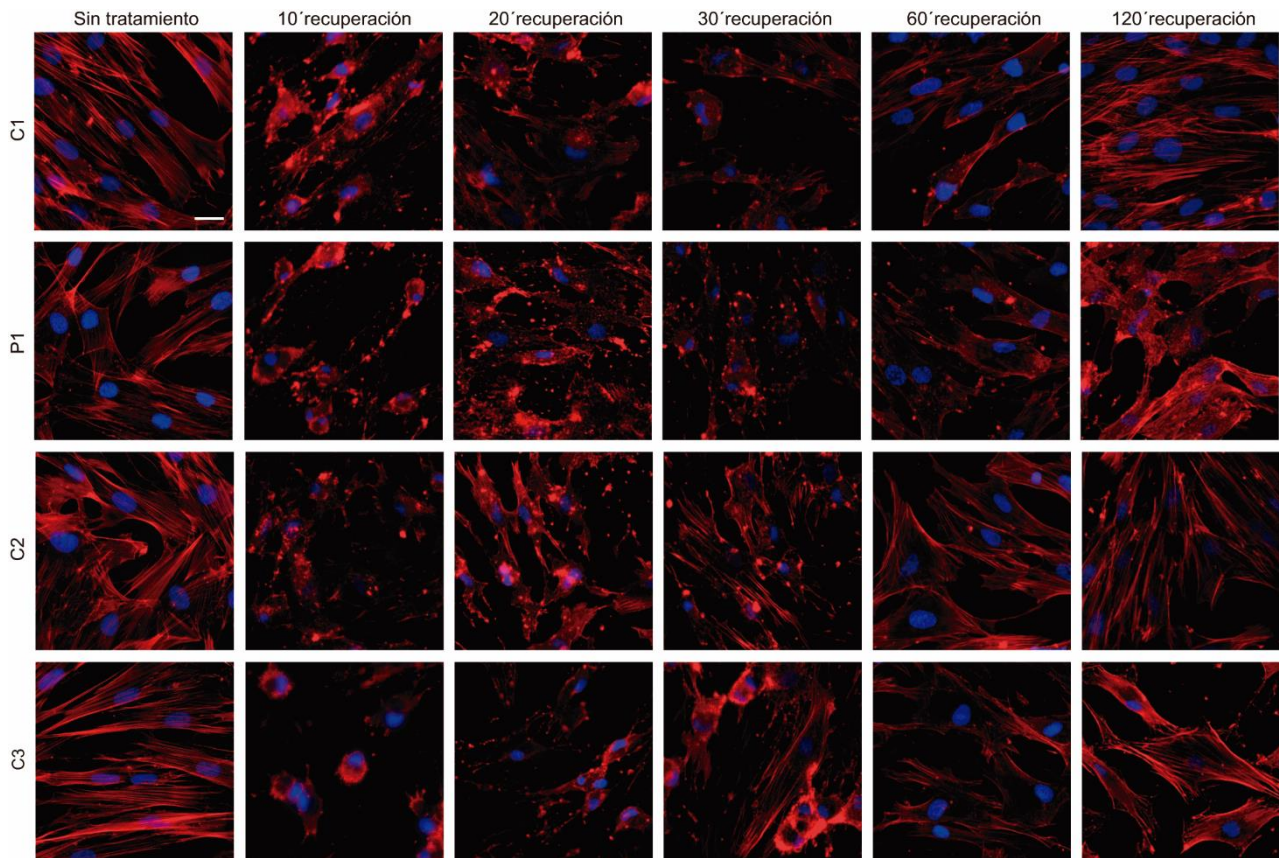


Figura 44. La ausencia de MK5 afecta la recuperación del citoesqueleto de F-actina. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas correspondientes a fibroblastos primarios de tres cultivos control diferentes (C1, C2 y C3) y la paciente II-3 de la familia 3 (P1) sin tratar o tratados con latrunculina B (2,5 μ M, 30 min) y mantenidos durante distintos tiempos de recuperación. Los filamentos de F-actina se marcaron con Alexa Fluor 546-faloidina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala = 25 μ m. n = 6 (C2, P1), n = 4 (C1, C3). En todos los experimentos, la recuperación del citoesqueleto de actina fue peor y más lenta en las células P1.

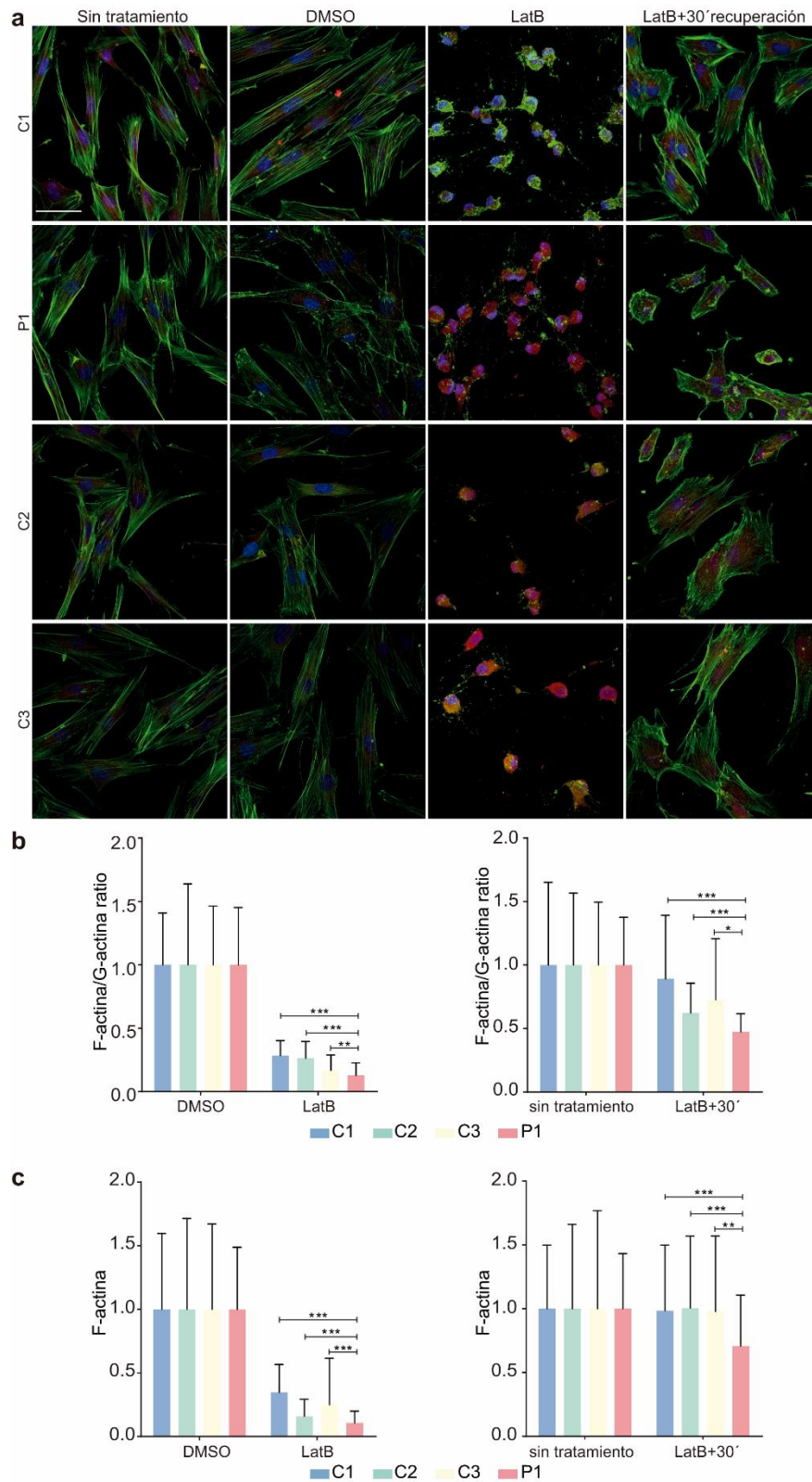


Figura 45. Cuantificación de F-actina/G-actina en fibroblastos primarios. a) Imágenes de microscopía confocal representativas (proyección máxima) de fibroblastos control (C1-C3) y de la paciente II-3 de la familia 3 (P1) teñidas simultáneamente con Alexa Fluor 488-faloidina (verde) y Alexa Fluor 594-DNasaI (rojo) para la visualización de actina filamentosa (F-actina) y actina globular monomérica (G-actina), respectivamente. Los fibroblastos se trataron con latrunculina B (LatB) o su vehículo (DMSO) y se fijaron o se dejaron recuperar durante 30 min (latB + 30'). También se analizaron y utilizaron como controles fibroblastos sembrados y

cultivados simultáneamente, que se mantuvieron sin tratar. Los núcleos se tiñeron con DAPI. $n = 4$ excepto para C3 ($n = 3$). Barra de escala = 50 μm . b) Cuantificación de la relación F-actina/G-actina en fibroblastos, determinada por la intensidad de fluorescencia. En el eje Y se representa la ratio F-actina/G-actina, calculada a través del parámetro “integrated density” normalizado en células individuales a partir de imágenes como las indicadas en el panel a). Para cada línea de fibroblastos, los valores F-actina/G-actina de LatB están referidos al valor medio de las mismas células tratadas con DMSO (izquierda), y los valores de LatB + 30' se refirieron al valor medio de las mismas células en la condición no tratada (derecha). Los datos se expresan como medias \pm SD. c) Igual que el panel b, pero para el parámetro “integrated density” de F-actina únicamente (eje Y). Los valores del parámetro “integrated density” de F-actina y F-actina/G-actina sin normalizar se muestran en la figura 46. Para cada condición, se analizaron $n \geq 44$ (C3) y $n \geq 87$ (C1, C2, P1) células individuales en b y c. Sólo se muestra la comparación estadística entre controles y fibroblastos P1, la cual se llevó a cabo mediante un test de Mann-Whitney de dos colas.

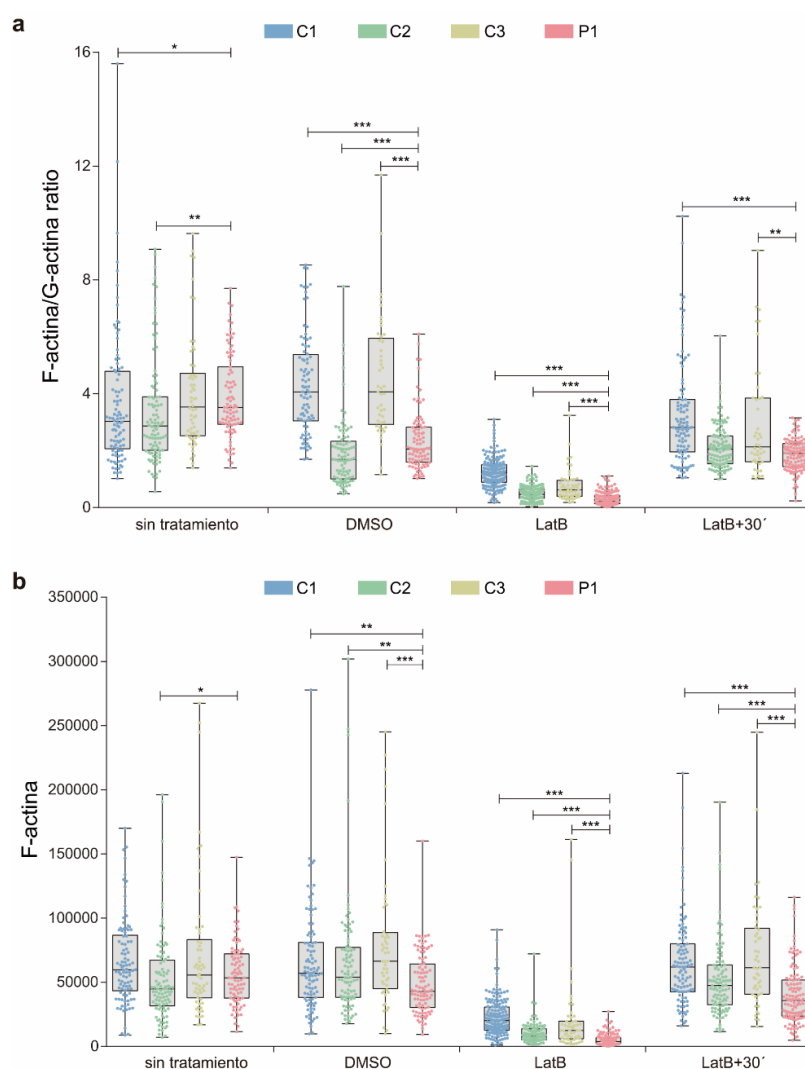


Figura 46. Cuantificación de F-actina/G-actina en fibroblastos primarios. a) Diagrama de cajas y bigotes correspondiente a la fracción F-actina/G-actina determinada por cuantificación de fluorescencia en los fibroblastos control (C1-C3) y de la paciente II-3 de la familia 3(P1), utilizando imágenes de microscopía confocal como las indicadas en Figura 45a. Los valores del parámetro “integrated density” sin normalizar para el cociente F-actina/G-actina se representan en el eje Y. b) Igual que en el panel a, pero para los valores del parámetro “integrated density” de F-actina sin normalización (eje Y). Se realizaron cuatro réplicas experimentales excepto para C3 que se realizaron tres. En cada condición, se analizaron $n \geq 44$ (C3) y $n \geq 87$ (C1, C2, P1) células individuales. Sólo se muestra la comparación estadística entre controles y fibroblastos P1, la cual se llevó a cabo mediante un test de Mann-Whitney de dos colas.



DISCUSIÓN

Capítulo 1: Caracterización de un nuevo tipo de miopatía congénita causada por mutaciones en el gen *FXR1*

En esta tesis doctoral se demuestra que mutaciones recesivas en el exón 15 de *FXR1* están asociadas con una nueva miopatía del tipo multi-minicore en humanos y ratón, cuya gravedad depende de las consecuencias de cada mutación sobre la proteína. En este trabajo, hemos identificado una mutación recesiva en el exón 15, específico de músculo, de *FXR1* en homocigosis en un paciente con fenotipo neuromuscular. La detección de otra variante recesiva en el mismo exón de *FXR1* por el laboratorio de la Dra. Grace Yoon (Estañ et al., 2019), en tres individuos de otra familia no relacionada con la familia 1, que también presentan fenotipo miopático, apoya el carácter patogénico de mutaciones en el exón 15 de *FXR1* para el desarrollo neuromuscular. Por otro lado, este trabajo también demuestra que ciertas mutaciones en *FXR1* conducen a la síntesis de proteínas iso-e/f aberrantes, que se acumulan en un nuevo tipo de estructuras granulares no membranosas dentro de la célula. Durante esta tesis, se generaron ratones CRISPR que reprodujeron el efecto de la mutación del ACAG humana en la proteína. El estudio de la patología muscular de estos ratones, y la de ratones portadores de otra mutación distinta en el exón 15 de *Fxr1*, evidenció características histopatológicas muy similares a las observadas por el equipo de la Dra. Grace Yoon en una biopsia muscular de uno de los pacientes de la familia 2, específicamente: atrofia muscular, lesiones multi-minicore, núcleos centralizados y predominio de fibras tipo I. El estudio funcional de estos ratones indicó una disminución de la fuerza muscular, una menor resistencia a la fatiga, así como cierta descoordinación al andar como resultado de las mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*. Esto está en consonancia con el estudio funcional realizado por Meintjes et al., 2004 en ratones *Fxr1-neo*, los cuales, aun no siendo KO completos para *Fxr1*, se caracterizan por expresar niveles reducidos de todas las isoformas de FXR1P.

Este trabajo también arroja luz sobre la relevancia funcional de las iso-e/f de *FXR1*, exclusivamente musculares, en comparación con el resto de las isoformas de *FXR1*. Todos los estudios previos con ratones KO o con morfolinós en *Xenopus* o pez cebra, implicaban la eliminación o silenciamiento, de todas las isoformas de FXR1P en todos los tejidos del espécimen (Marc-Etienne Huot et al., 2005; Meintjes et al., 2004; Van't Padje et al., 2009). Datos obtenidos en el mismo laboratorio en el que se ha realizado esta tesis doctoral, mostraron que la eliminación dependiente de *Myf5-Cre* de todas las isoformas *FXR1*, produce letalidad neonatal (Estañ et al., 2019). *Myf5* codifica el factor de transcripción miogénico de expresión más temprana, que determina la diferenciación de las células progenitoras hacia el linaje del músculo esquelético, y está involucrado en la especificación de estas células a mioblastos (Biressi et al., 2013; Ott et al., 1991). Por tanto, la pérdida de todas las isoformas de FXR1P, únicamente en el linaje miogénico esquelético, es suficiente para causar mortalidad neonatal (Estañ et al., 2019). En este trabajo, se ha estudiado el efecto de mutaciones que alteran exclusivamente las iso-e/f de FXR1P comprobando, que ratones portadores de este tipo de mutaciones son viables, incluso si las mutaciones están asociadas con una ausencia casi total de estas

iso-e/f (ratones dupA), o tienen una distribución subcelular completamente anómala (ratones delACAG). En base a esto, es posible concluir que, el fenotipo letal de los KO condicionales *Myf5-Cre;Fxr1*, debe ser causado principalmente por la pérdida de las isoformas cortas (iso-a-d) de FXR1P, que se expresan específicamente en progenitores miogénicos tempranos. La función de P82-84, según lo observado en los ratones con mutaciones en el exón 15 de *Fxr1*, consistiría en mantener la alineación de los miofilamentos y la organización de los discos Z. Los resultados aquí descritos están en concordancia con los obtenidos recientemente por el grupo de Smith et al., 2020, quienes, inhibiendo el splicing alternativo del exón 15 o generando mutaciones que provoquen un frameshift en este exón, obtienen defectos en la formación de los somitas y colas curvadas en *Xenopus*. Este grupo también ha comprobado, que el silenciamiento de todas las isoformas *Fxr1* en células C2C12, provoca una disminución de la fusión de las células para la formación de miotubos (Smith et al., 2020). En esta tesis, los resultados obtenidos en mioblastos de V-4 de la familia 1 demuestran, que la mutación delACAG, la cual altera exclusivamente la localización subcelular de las iso-e/f, produce una disminución importante en el índice de fusión durante la formación de los miotubos *in vitro*, sugiriendo así la participación de las isoformas P82-84 en esta función. Mutaciones en otros genes implicados en enfermedades neuromusculares también se han correlacionado con alteraciones en el índice de fusión, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Blondelle et al., 2015; Bricceno et al., 2014; X. Li et al., 2017; Park et al., 2016; Wilding et al., 2014).

Aunque previamente se había descrito la localización de FXR1P como un patrón punteado que recordaba a estructuras costaméricas (Dubé et al., 2000; Engels et al., 2004; Marc-Etienne Huot et al., 2005; Meintjes et al., 2004; Whitman et al., 2011), en este trabajo se intentó refinar dicha localización mediante experimentos de co-inmunolocalización. Este estudio ha permitido concluir, que las iso-e/f de FXR1P se localizan en una posición inmediatamente adyacente al disco Z, entre las dos tríadas que flaquean cada banda Z y solapando de manera parcial con mitocondrias. Las fibras musculares de los ratones mutantes para el exón 15 de *Fxr1* no presentaron una alteración obvia en el patrón de expresión de RYR, pero si se detectaron cambios con respecto a la distribución mitocondrial. Existe una interacción entre el SR y las mitocondrias en el músculo esquelético, a la que se le asignan diversas funciones entre las que se encuentran: i) el acoplamiento entre la liberación de Ca^{2+} y la síntesis de ATP necesarias para el proceso de excitación-contracción, ii) la señalización local por parte de especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas implicadas en apoptosis, iii) la síntesis de fosfolípidos y iv) transporte de proteínas entre las dos estructuras. Esta interacción es llevada a cabo por diversas proteínas de anclaje, como la mitofusina-2, chaperonas, o canales de iones dependientes de voltaje, cuyo papel en la interacción SR-mitocondrias aún no se conoce en profundidad (Dirksen, 2009; Eisner et al., 2013). Teniendo en cuenta, por un lado, la localización de las iso-e/f wt de FXR1P y, por otro, la alteración del patrón mitocondrial, así como una variación en el perfil de expresión de genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} , en los ratones CRISPR con mutaciones específicamente en estas isoformas, sería interesante comprobar en un futuro, la posible implicación de las isoformas musculares de FXR1P en el

mantenimiento de la interacción SR-mitocondria en el músculo esquelético, de forma directa a nivel estructural, o a través de la regulación de la traducción de ARNm implicados en dicha interacción.

En las neuronas, FMR1P juega un papel como represor de la traducción de ARNm en un tipo de gránulos que son transportados desde el soma neuronal a las dendritas, y que contienen también otras ribonucleoproteínas (De Diego Otero et al., 2002; Mazroui et al., 2002). En función de la homología, estructural y funcional entre FMR1P y FXR1P, se ha postulado que FXR1P también podría actuar manteniendo ARNm específicos en un estado reprimido en los costámeros, hasta que se requiera su traducción para la síntesis de proteínas *de novo* (Marc-Etienne Huot et al., 2005). Esta función de FXR1P como represor de la traducción fue analizada *in vitro* por Whitman et al., 2011, quienes tras observar que el incremento en los niveles de las proteínas costaméricas desmoplaquina y talina-2 en corazón de ratones *Fxr1* KO no era debido a cambios, ni en la localización ni en los niveles de su ARNm, determinaron, mediante un ensayo de luciferasa, que FXR1P se unía *in vitro* al 3'UTR del ARNm de estas dos proteínas, actuando como un regulador negativo de su traducción. De acuerdo con esta hipótesis, en esta tesis doctoral se observó, tanto en mioblastos control como en HeLa transfectadas, que la iso-e wt puede ser reclutada en SG, algo ya comprobado por Mazroui et al. 2002, los cuales se caracterizan por reprimir la traducción de diversos ARNm. Es posible, por tanto, especular que, una alteración en la regulación de la traducción de los ARNm específicos implicados en la organización de la línea Z, podría estar detrás de los fenotipos mini-core resultantes de mutaciones en las iso-e/f.

Por otro lado, está descrito que la presencia de IDD, así como la facultad de unión a ARN, incrementa la capacidad de diversas ribonucleoproteínas a sufrir una separación de fase liquido-liquido (LLPS), formando gránulos no membranosos, como cuerpos de Cajal, cuerpos-P y SG, que engloban parte del citosol o del nucleoplasma (Banani et al., 2017; Molliex et al., 2015). Todas las isoformas de FXR1P, además de varias regiones de unión a ARNm, contienen un IDD en el extremo Ct, y Smith et al., 2020, han comprobado, que tanto la iso-a como la iso-e tienen la capacidad de formar agregados. Sin embargo, el Ct de las isoformas musculares es de mayor longitud, contiene secuencias extra de unión a ARN y un IDD más largo, lo que contribuiría a incrementar la capacidad de las iso-e/f de formar agregados en comparación con las isoformas cortas. Si bien las mutaciones del exón 15 de *FXR1* descritas en esta tesis doctoral, provocan un cambio en el marco de lectura, generando un PTC y produciendo una proteína de menor tamaño que la iso-e wt, las iso-e mutadas siguen presentando un Ct con un IDD de mayor longitud que la iso-a, y regiones extra de unión a ARNm, manteniendo, por tanto, la capacidad intrínseca de la iso-e wt a sufrir LLPS y formar gránulos. Por otro lado, se ha comprobado previamente que la fosforilación de residuos, mediante la proteína DYRK3, inhibe la separación de fase y promueve la disolución de los gránulos (Rai et al., 2018; Wippich et al., 2013). Al realizar una simulación bioinformática de las modificaciones que sufre el extremo Ct en las distintas iso-e mutadas, se observó una disminución del número de residuos potencialmente fosforilados en las tres variantes mutantes con respecto a la iso-e normal. Teniendo en cuenta, que la mayor parte de los aminoácidos susceptibles de ser fosforilados en FXR1P se encuentran altamente concentrados en el IDD del extremo Ct

(Smith et al., 2020), se podría especular que la disminución de estos residuos, debido a las mutaciones en el exón 15, podría aumentar la capacidad de agregación de las iso-e mutadas.

La capacidad de FXR1P de sufrir LLPS podría justificar que todas sus isoformas formen parte de SG. Sin embargo, los gránulos delACAG, aunque mantienen la capacidad de FXR1P de unir ARNm, no forman parte de SG, cuerpos-P o agresomas. En células HeLa transfectadas se comprobó, que la expresión de las tres mutaciones en el exón 15 descritas en este trabajo (delACAG, delA y dupA), son capaces de formar estos gránulos anulares. Como los pocos aminoácidos adicionales incorporados en el dominio Ct después de la mutación dupA, difieren de los residuos añadidos por las mutaciones delA/delACAG, se puede concluir, que la acumulación de las variantes de la iso-e mutantes en gránulos del tipo delACAG en HeLa no depende de una secuencia de aminoácidos Ct específica, ni de la necesidad de un ambiente miogénico. Esto induce a pensar que los gránulos delACAG observados en el paciente de la familia 1, así como en el ratón avatar correspondiente, podrían corresponder al plegamiento incorrecto y la agregación posterior de las isoformas mutantes de *FXR1*, como se describe para otras proteínas en algunas enfermedades neurodegenerativas, que generan toxicidad celular y contribuyen al colapso de la maquinaria de degradación proteica (Sweeney et al., 2017). A pesar que en células HeLa transfectadas con la iso-e-dupA se observó la acumulación de esta isoforma como gránulos citoplasmáticos anulares, la ausencia de gránulos de FXR1P en los ratones dupA probablemente se deba a los bajos niveles de expresión de las variantes correspondientes, detectada en el tejido muscular de ratones dupA. En cuanto a la mutación delA, no se pudo disponer de material biológico de la familia 2 para demostrar, si la ausencia de gránulos en la biopsia de la familia 2, está relacionada con la disminución *in vivo* de los niveles de ARNm o proteína correspondientes a esta forma mutada de iso-e.

El fenotipo de los ratones mutantes del exón 15 indica que la mutación dupA da lugar a una patología menos grave que la variante delACAG, lo que es muy probable que esté relacionado con el efecto diferente de cada mutación sobre la proteína ya que: (1) la cantidad de FXR1P en los discos Z fue significativamente menor en las fibras delACAG que en las dupA donde se llegó a apreciar un marcaje FXR1P residual, y (2) solo las isoformas delACAG se acumulan en estructuras granulares específicas que interactúan con ARNm. Por lo tanto, la patología de los ratones delACAG no resulta exclusivamente de la ausencia total de las iso-e/f de su localización subcelular normal, sino también de su acumulación en gránulos que, además de alterar la estructura de las fibras, acumulan ARNm y, por tanto, deben interferir con el tráfico y regulación traduccional de ARNm. Si bien los pacientes de la familia 2 presentaron hipotonía al nacimiento, al igual que el probando de la familia 1, y un posterior retraso en el desarrollo de las habilidades motoras, la afectación clínica en los tres hermanos de la familia 2 fue más leve que en los pacientes de la familia 1. Las diferencias fenotípicas entre los ratones delACAG y dupA proporcionan una explicación para la variabilidad fenotípica entre los pacientes con diferentes mutaciones en FXR1P. De hecho, el equipo de la Dra. Grace Yoon no distinguió acumulaciones granulares de FXR1P en la familia 2 tras el análisis por TEM de la biopsia de tejido muscular. Independientemente a lo anterior, no es rara la existencia de variabilidad fenotípica en los trastornos

neuromusculares monogénicos, como ocurre en el rango de fenotipos asociados con mutaciones en la proteína RYR1 (Zhou et al., 2007) y entre pacientes con atrofia muscular espinal (Lewelt et al., 2012).

Teniendo en cuenta el músculo cardíaco, el probando de la familia 1 tuvo episodios de taquicardia, y su hermana anterior presentaba un defecto en el tabique auricular. En *Danio reiro* está descrita una alteración en el desarrollo y funcionamiento del corazón como consecuencia del silenciamiento de *fxr1* (Van't Padje et al., 2009). En el corazón de ratones *Fxr1* KO se ha comprobado, que se produce una alteración de la arquitectura de los desmosomas, así como de las miofibrillas las cuales parecen extenderse y perder sus conexiones laterales (Whitman et al., 2011). Del mismo modo, se ha relacionado FXR1P con el mantenimiento de los discos intercalantes y de las uniones tipo gap en el corazón, observándose una expresión incrementada de FXR1P en pacientes y modelos de ratón con miocardiopatía dilatada del ventrículo izquierdo, así como un incremento de episodios de taquicardia ventricular y una redistribución de las uniones gap en ratones donde se sobreexpresa FXR1P (Chu et al., 2018). Puesto que las iso-e/f son las principales isoformas FXR1P en el músculo cardíaco, no es descartable un potencial efecto de las mutaciones en el exón 15 de *FXR1* en este tejido, por lo que está pendiente un análisis robusto del tejido y función cardíaca en los ratones modelo utilizados en esta tesis doctoral

Si bien en testículo se expresan todas las isoformas de FXR1P, se ha documentado un incremento de la expresión de las iso-e/f a lo largo de la maduración del testículo, así como la presencia de estas dos isoformas de FXR1P a lo largo del flagelo del espermatozoide en ratón, habiendo sido purificadas junto a estructuras microtubulares del flagelo (M.-E. Huot, 2001). También se ha descrito en la literatura una disminución en la expresión de *FXR1* en pacientes con infertilidad astenozoospermica (Bansal et al., 2015). Por tanto, sería interesante comprobar en un futuro, si los ratones mutantes para el exón 15 de *FXR1* presentan alteraciones de fertilidad para poder descifrar el papel de isoe/f en la espermatogénesis.

El análisis del perfil de expresión génica del tejido muscular de ratones delACAG, identificó la vía de señalización de *p53* como una vía principal de GO/KEGG y reveló la inducción de genes relacionados con la parada del ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis y la inflamación, algunos de los cuales son genes diana de *p53*. Los niveles aumentados de los transcritos *Trp73* y *Trp63* en mutantes delACAG, son muy probablemente los responsables de la activación de las dianas de *p53* en estos ratones, ya que comparten roles funcionales con esta proteína (Müller et al., 2006; Zaika & El-Rifai, 2006). No obstante, la sobreexpresión de algunos genes regulados por *p53*, como *Cdkn1a*, en mutantes delACAG podría ser consecuencia de los niveles incrementados de *p73*, o de la pérdida de función de FXR1P ya que está descrito que el ARNm de *Cdkn1a* es desestabilizado por FXR1P (Laetitia Davidovic et al., 2013; Jost et al., 1997; Majumder et al., 2016b). *Bex1* codifica una ribonucleoproteína que media en la estabilización de ARNm de genes proinflamatorios, incluido *Cxcl10* (Accornero et al., 2017). Los niveles de transcripción de *Bex1* y *Cxcl10*, aumentaron en ratones delACAG, lo que apunta a la desregulación del programa proinflamatorio en estos ratones. Esto concuerda con lo descrito por Herman et al. 2018, quienes caracterizaron la función de

FXR1P en el control de la expresión de genes proinflamatorios en las células vasculares del músculo liso, al observar que el silenciamiento de FXR1P incrementa la cantidad y estabilidad del ARNm de genes inflamatorios, mientras que la sobreexpresión de FXR1P las reducía. En el análisis de la expresión génica de los ratones delACAG también se observó la presencia de varios DEGs comunes a otras miopatías. Estos genes están relacionados con la regeneración de la fibra, como *Myh3*, o con lesiones musculares y atrofia como *Gdf15*, *Mstn* o *Nos1* (Almeida et al., 2016; Brenman et al., 1995; Patel et al., 2016). También se observó un incremento en los niveles de ARNm y proteína de ANKRD1 en ratones delACAG. Esta proteína ha sido implicada en la coordinación de la expresión de genes involucrados en la estructura celular y proliferación en cardiomiocitos (Laure et al., 2009), juega un papel durante la variación de masa muscular (Carson et al., 2002) y está ampliamente descrito en la literatura que, tanto en humano como en ratón, su expresión proteica se ve incrementada en distintas patologías musculares (Bakay et al., 2002; Casey et al., 2008; Laure et al., 2009; Nakada, Oka, et al., 2003; Nakada, Tsukamoto, et al., 2003; Nakamura et al., n.d.; Porter et al., 2002; Suzuki et al., 2005; Witt et al., 2004). El incremento en los niveles transcripcionales y proteicos de sarcolipina (SLN) en ratones delACAG, sugiere una homeostasis anormal de Ca^{+2} asociado a mutaciones en iso-e/f, ya que SLN (Odermatt et al., 1998) es un inhibidor de los transportadores de Ca^{+2} SERCA, los cuales bombean Ca^{+2} desde el citosol al SR después de la excitación-contracción. Este hecho es especialmente interesante ya que, aproximadamente en el 50% de los pacientes con miopatías multi-minicore se encuentran mutaciones recesivas en RYR1 y SEPN1, ambos genes relacionados también con la homeostasis de Ca^{+2} (Jungbluth et al., 2011; Liewluck et al., 2016). RYR1 es un canal de Ca^{+2} anclado a la membrana del SR, cuya interacción con el receptor del sarcolema DHPR es esencial para que tenga lugar el acoplamiento excitación-contracción (Grabner & Dayal, 2010), y SEPN1 regula a RYR1, interactuando directamente con él y modulando su actividad, afectando tanto a la capacidad del canal para liberar Ca^{+2} , como para funcionar como un sensor redox (Juryneć et al., 2008). Además de estos dos genes, en miopatías tipo minicore se han descrito mutaciones recesivas en *TTN*, *MEGF10*, *CACNA1S* y *SECISBP2*, y mutaciones dominantes en *ACTN2*, *CACNA1S*, *ACTA1* y *MYH7*, y una mutación en *CCDC78* en una sola familia con herencia dominante (Claeys, 2020; Fusto et al., 2019; Jungbluth et al., 2011; Liewluck et al., 2016; Schartner et al., 2017).

Respecto al fenotipo óseo observado en la familia 1 y en los ratones avatar, podría ocurrir que la sobreexpresión de genes proinflamatorios detectada en ratones delACAG contribuya a dicho fenotipo, ya que las citocinas proinflamatorias tienen efectos adversos sobre la DMO (Clowes et al., 2005). No obstante, la disminución del movimiento fetal, que a menudo conduce a artrogriposis, fracturas y huesos hipomineralizados (Shea et al., 2015), es posiblemente la causa más probable de las fracturas óseas y el fenotipo artrogripótico de la familia 1. El espectro fenotípico completo asociado a mutaciones en *FXR1* se podrá ir perfeccionando a medida que se describan más pacientes con mutaciones en este gen

Capítulo 2: Mutaciones bialélicas en *MAPKAPK5* causan una alteración del desarrollo caracterizada por anomalías neurológicas, cardíacas y faciales junto con simpolidactilia

En esta tesis también se han identificado variantes bialélicas de pérdida de función en *MAPKAPK5* como la causa de un nuevo síndrome con herencia recesiva, que involucra alteraciones graves del desarrollo neurológico, malformaciones cardíacas y alteración del número de dígitos de las extremidades. Comparando el estudio clínico de los dos miembros afectados de la familia 3 (II-3 y II-5), con el del paciente caracterizado por el equipo de los Drs. Denise Horn y Felix Boschann (familia 4, Tabla 8) (Horn et al., 2021), los tres pacientes descritos, hasta ahora, con variantes patogénicas bialélicas en *MAPKAPK5* fueron diagnosticados con un defecto cardíaco congénito: dos tenían un defecto cardíaco congénito complejo (la afectada II-3 de la familia 3 y el afectado de la familia 4) y el tercero (II-5 de la familia 3) una persistencia del conducto arterioso (CAP) y comunicación interauricular (CIA). Los tres pacientes de ambas familias también presentaron un retraso del desarrollo psicomotor importante. La probando II-3 de la familia 3 no camina a la edad de 9 años, el paciente de la familia 4 no fue capaz de sentarse sin ayuda a la edad de 19 meses, y la afectada II-5, a la edad de 2 años y 7 meses, no era capaz de sostener la cabeza. Tanto el afectado diagnosticado por el equipo de los Drs. Denise Horn y Felix Boschann (familia 4), como las hermanas II-3 y II-5 de la familia 3, no lograron la comunicación verbal a la edad de 19 meses, 9 años y 2 años y 7 meses respectivamente. Las tres personas afectadas compartieron irregularidades en el EEG, con indicios de susceptibilidad a sufrir convulsiones en todas ellas. Asimismo, se detectaron anomalías cerebrales de carácter variable en todos los afectados, que incluyen: dilatación del 4º ventrículo, hemisferios cerebelosos pequeños e hipoplasia del cuerpo calloso. En los afectados de ambas familias, también se observaron anomalías oculares variables, concretamente, palidez del disco óptico y retina teselada, nistagmo, cataratas y esclerocórnea. En dos pacientes, uno de cada familia (la paciente II-3, de la familia 3 y el paciente de la familia 4), se observó discapacidad auditiva y grados variables de simpolidactilia postaxial de manos y/o pies. Clínicamente, el dedo supernumerario fue definido como hipoplásico y consistentemente estaba localizado entre el 4º y el 5º dígitos, por lo que puede haberse ramificado desde una de las falanges media o distal del 5º radio o desde el metatarsiano V. En todos los casos, el dedo supernumerario estaba conectado por sindactilia cutánea al 5º dedo. La simpolidactilia tipo 1 (MIM: 186000), tipo 2 (MIM: 608180) y tipo 3 (MIM: 610234) difieren de la simpolidactilia aquí descrita porque en las primeras la sindactilia cutánea se localiza consistentemente entre los dedos medio y anular con un dedo adicional entre el 4º y 5º dedo. El tipo de simpolidactilia descrito aquí puede considerarse muy específico y, por consiguiente, útil en el diagnóstico clínico de este síndrome. Por otro lado, los tres pacientes tenían en común anomalías faciales que incluían una frente prominente, fisuras palpebrales estrechas, labios finos y retrognatia. Dos de ellos nacieron con medidas antropométricas normales, mientras que uno nació con peso reducido. En cuanto al desarrollo, dos fueron caracterizados con

baja estatura y retraso del crecimiento (afectadas de la familia 3), y dos de ellos desarrollaron microcefalia postnatal (II-5 de la familia 3 y el probando de la familia 4) (Tabla 8).

La función fisiológica de MK5 se ha estudiado utilizando dos ratones deficientes en *Mapkapk5* diferentes, generados mediante la sustitución del exón 6 (Δ ex6) o una parte importante del exón 8 (Δ ex8) (Shi et al., 2003; Sun et al., 2007). Los ratones homocigotos, Δ ex6 y Δ ex8, fueron descritos como viables, fértiles y sin anomalías aparentes, con la excepción de que en el fondo genético C57/B6 los mutantes homocigotos Δ ex6 exhibieron letalidad embrionaria con penetrancia incompleta (50%). Puesto que en la progenie de cruces entre ratones C57/B6 Δ ex6 heterocigotos, los mutantes homocigotos Δ ex6 estaban infrarrepresentados, al menos después de E12, se sugirió que la causa más probable de estas pérdidas embrionarias serían defectos del desarrollo (Schumacher et al., 2004). En general, a excepción de la letalidad embrionaria dependiente del fondo genético de los ratones Δ ex6 antes mencionada, las consecuencias fenotípicas de las variantes patogénicas en *MAPKAPK5* en humanos son de mayor gravedad, lo que sugiere un papel más crítico de MK5 en el desarrollo del tejido neural y el corazón en humanos.

Un estudio previo de WB en fibroblastos embrionarios de ratón derivados de ratones homocigotos Δ ex6 y Δ ex8, demostró que estas células sintetizan una cantidad residual de proteína MK5 mutante, procedente de la traducción de transcritos de *Mapkapk5* en los que se había excluido el exón 6, o el exón 8 respectivamente, ya que la ausencia de cualquiera de estos exones no altera el marco de lectura del ARNm (Ronkina et al., 2015). En contraste con esto, el análisis de WB de los fibroblastos dérmicos del individuo afectado II-3 de la familia 3, demostró la ausencia completa de las isoformas de la proteína MK5. Sin embargo, debido a que se usó un anticuerpo anti-MK5 Ct, no se puede excluir que las células del paciente puedan sintetizar una cierta cantidad de proteína MK5 truncada Nt [p.(Ala70Valfs*7)], puesto que, como se ha mostrado en la figura 43, el mecanismo de NMD resultó ser parcialmente eficiente en estas células. Los fibroblastos de la paciente II-3 de la familia 3 también presentaron niveles reducidos de la proteína ERK3, un hallazgo que también había sido observado en ratones *Mapkapk5*^{-/-} (Brand et al., 2012; Schumacher et al., 2004).

Diversos estudios, utilizando siRNA y mutantes para la chaperona HSP27 y MK5 han determinado que estas dos proteínas están implicadas en el reordenamiento de la F-actina a través de la vía AMPc/PKA (Gerits et al., 2007; Kostenko et al., 2009; Kostenko & Shiryaev, 2011). La remodelación de la actina es un proceso necesario para aspectos clave de la célula, como la motilidad celular, la morfología celular o el tráfico de vesículas intracelulares (Svitkina, 2018) y también es esencial para la plasticidad de las espinas dendríticas implicadas en la sinapsis (Fischer et al., 1998). HSP27, actúa uniéndose a los monómeros de actina (actina globular) impidiendo su polimerización y la formación de filamentos de actina (Boivin et al., 2012; Tak et al., 2007). La fosforilación de HSP27 por MK5 provoca la disociación de HSP27 de la actina monomérica, pudiendo esta última ser utilizada para formar filamentos de actina (Gaestel, 2006; L New et al., 1998; Shiryaev & Moens, 2010). La fosforilación de HSP27 mediada por MK5, está regulada por otras proteínas como son 14-3-3 ϵ y hTid-1, las cuales se unen a MK5, inhibiéndola e impidiendo la fosforilación de HSP27,

limitando así la polimerización de la actina (Choi et al., 2012; Tak et al., 2007). Esta tesis ha puesto de manifiesto una recuperación alterada de la F-actina, después del tratamiento con latrunculina B, en fibroblastos dérmicos deficientes para MK5, lo que apoya el papel previamente reconocido de MK5 en la regulación de la polimerización de la F-actina.

La disminución de la expresión de SEPT7 tiene como consecuencia la alteración en la ramificación de las dendritas, indicando la importancia de esta proteína en la morfogénesis de las espinas y el desarrollo de las dendritas durante la maduración neuronal (Tada et al., 2007). Los KO *Mapkapk5*^{-/-} (Δ ex6) han sido descritos con deficiencia en la formación de espinas dendríticas, sugiriendo Brand y colaboradores en 2012 que este proceso está regulado por la modulación de SEPT7 a través del complejo ERK3-MK5 (Brand et al., 2012). Además, durante el estado inicial de la asociación de las células de Schwann a los axones neuronales, existe una dependencia entre los complejos multiproteicos que contienen SEPT7 y los filamentos de actina. Este es un paso esencial para la organización en la interacción axo-glial, que resulta en la mielinización axonal en el sistema nervioso periférico y del que depende la correcta transmisión del impulso nervioso (Roth et al. 2013). Relacionado también con el papel de MK5 en el desarrollo neurológico, se ha estudiado que ERK3/MK5 interaccionan con la ubiquitina ligasa E6AP (Martínez-Noël et al. 2012). Si bien aún no están del todo esclarecidas las consecuencias de esta interacción, es posible que pudiera estar implicada en el desarrollo cognitivo, ya que mutaciones de pérdida de función en el alelo materno del gen *UBE3A*, que codifica E6AP, un gen que sufre impronta genética con expresión preferencial del alelo materno en el sistema nervioso central, dan lugar al síndrome de Angelman (AS), un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por un retraso mental severo, disfunción motora y autismo (Dindot et al., 2008). Utilizando un modelo murino de AS se comprobó que los cerebros de estos animales, aun manteniendo una arquitectura celular normal, presentaban, de forma similar a los ratones *Mapkapk5*^{-/-}, neuronas con espinas dendríticas reducidas en tamaño y densidad, sugiriendo Dindot y colaboradores que E6AP podría funcionar regulando el desarrollo de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica (Dindot et al., 2008). Todo esto es consistente con los defectos cognitivos observados en los tres pacientes descritos, hasta la fecha, con mutaciones en *MAPKAPK5*, los cuales ponen de manifiesto la importancia del papel de MK5 en el neurodesarrollo.

En el corazón de ratón adulto, la proteína MK5 se expresa en fibroblastos ventriculares, pero no en miocitos ventriculares (Nawaito et al., 2017), y los fibroblastos ventriculares *Mapkapk5*^{-/-} también se han caracterizado con un citoesqueleto de actina alterado y motilidad reducida (Nawaito, Sahadevan, Clavet-Lanthier, et al., 2019). MK5 puede tener un efecto cardioprotector al fosforilar HSP27, ya que el incremento de la fosforilación de esta chaperona, inducida por condiciones patológicas como son presión arterial elevada, fallo cardíaco, isquemia, shock hemorrágico y estrés oxidativo, previene la disfunción cardíaca (Moens & Kostenko, 2012). Además, se ha comprobado que condiciones patológicas, como el incremento de la presión arterial provocado en corazones aislados de rata mantenidos con perfusión retrógrada para elevar la presión aórtica, incrementa la activación de MK5 (Boivin et al., 2012). Es posible, por tanto, que la regulación

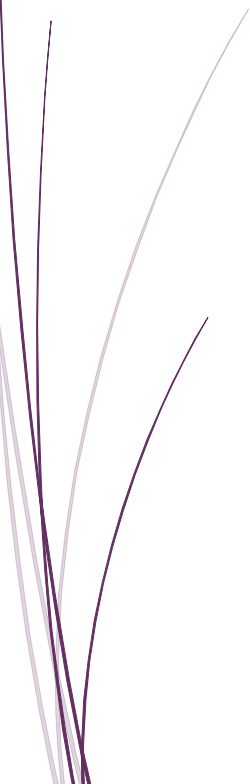
anormal de la dinámica del citoesqueleto de actina debido a la pérdida de actividad de MK5, probablemente contribuya a las anomalías cardíacas observadas en los pacientes de este trabajo.

Otros estudios, llevados a cabo en el modelo de ratón $\Delta ex8$, sugirieron que MK5 puede tener un papel supresor de tumores induciendo senescencia celular mediada por $p38^{MAPK}$ en respuesta a la vía de señalización Ras. Estos estudios demostraron que tanto los ratones heterocigotos (*Mapkapk^{+/-}*) como homocigotos (*Mapkapk^{5-/-}*), estos últimos en mayor grado, eran más susceptibles a la carcinogénesis cutánea inducida por dimetilbenzantraceno (DMBA) en comparación con sus compañeros de camada wt, y que en los papilomas generados en los ratones deficientes para MK5 existía una ausencia de diversos marcadores de senescencia (Sun et al., 2007). En otra serie de experimentos realizados en células NIH3T3 transfectadas o microinyectadas con distintos vectores para sobreexpresar *Ras* junto con *Mapkapk5*, se demostró que MK5 disminuye la respuesta de proliferación y expresión génica inducida por RAS. En concreto, se concluyó que MK5 actuaría aguas abajo de $p38^{MAPK}$ para suprimir la señalización de RAS-MAPK, posiblemente interfiriendo con la activación de JNK mediada por RAS (Chen et al., 2000; Yoshizuka, Lai, et al., 2012). No obstante, a pesar de esta posible función de MK5 como supresor de la vía de RAS, existe sólo un grado limitado de superposición clínica entre las características de los pacientes con mutaciones en MK5 y el espectro fenotípico de las RASopatías, las cuales, se asocian con variantes patogénicas que conducen a la hiperactivación de la señalización de RAS-MAPK (Tajan et al., 2018). Tanto los individuos con RASopatías, como los pacientes con mutaciones en MK5 tienen defectos cardíacos congénitos y retraso en el desarrollo. Sin embargo, los individuos con diferentes formas de RASopatías muestran rasgos típicos que son diferentes a los de los pacientes de este estudio y no comparten otras manifestaciones identificadas en los afectados reportados en esta tesis como anomalías cerebrales, simpolidactilia y microcefalia.

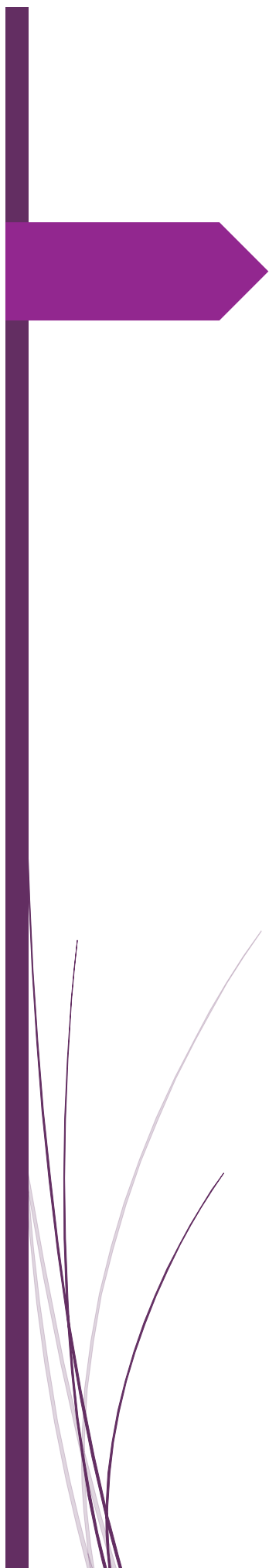
La caracterización molecular y fenotípica de más afectados con esta entidad, así como el estudio de modelos experimentales como células madre pluripotentes inducidas (iPS) de pacientes, posteriormente diferenciadas a distintos tipos celulares, u otros modelos animales, como por ejemplo ratones avatar generados mediante CRISPR, donde se diseñe específicamente la alteración detectada en personas afectadas, y su posterior caracterización en profundidad, ayudará a determinar el espectro fenotípico de variantes patogénicas en *MAPKAPK5*.



CONCLUSIONES



1. En esta tesis se ha determinado, por primera vez, que variantes bialélicas en los genes *FXR1* y *MAPKAPK5* causan dos síndromes congénitos específicos asociados a alteraciones del desarrollo.
2. Mutaciones en el exón 15, específico de músculo, de *FXR1* dan lugar a una enfermedad con fenotipo miopático.
3. Ratones con mutaciones en el exón 15 de *Fxr1* desarrollan un fenotipo muscular caracterizado por: atrofia muscular, núcleos centralizados, lesiones multi-minicore y predominio de fibra tipo I.
4. Las diferencias fenotípicas encontradas entre dos líneas de ratón portadoras de distintas mutaciones en el exón 15 de *Fxr1* las cuales están probablemente relacionadas con el efecto de cada mutación en la cantidad y localización de la proteína mutada, podría explicar la variabilidad fenotípica encontrada en pacientes.
5. En el ratón, las isoformas e y f de FXR1P no son esenciales para su supervivencia, pero son necesarias para mantener la estructura sarcomérica de las fibras del músculo esquelético. Las isoformas e y f también son requeridas durante el proceso de fusión de los mioblastos.
6. Ciertas mutaciones en el exón 15 de *FXR1* resultan en proteínas aberrantes que se acumulan en el citoplasma de las fibras musculares formando un nuevo tipo de gránulos. Estos gránulos reclutan ARNm, pero no son gránulos de estrés, ni cuerpos-P, ni agresomas.
7. Mutaciones en el exón 15 de *Fxr1* producen alteraciones en varias vías de señalización, como la vía de señalización mediada por proteínas de la familia de *p53*, en genes implicados en inflamación y apoptosis, así como en proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} en el músculo esquelético.
8. Mutaciones bialélicas de pérdida de función en el gen *MAPKAPK5* causan un retraso importante del desarrollo que incluye: alteraciones neurológicas, cardíacas y faciales, en combinación con simpodactilia.
9. El déficit de proteína MK5 causado por mutaciones de pérdida de función en *MAPKAPK5* también provoca una disminución de la cantidad de proteína interaccionante ERK3.
10. La falta de MK5 en fibroblastos primarios de un paciente con mutaciones bialélicas en *MAPKAPK5* empeora la recuperación de F-actina en estas células después de un tratamiento con Latrunculina-B.



BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M. K., Kahle, K. T., Saelzler, M. P., Orth, K., Dixon, J. E., & Rosner, M. R. (2001). ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21272–21279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100026200>
- Aberg, E., Perander, M., Johansen, B., Julien, C., Meloche, S., Keyse, S. M., & Seternes, O. M. (2006). Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), 35499–35510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606225200>
- Aberg, E., Torgersen, K. M., Johansen, B., Keyse, S. M., Perander, M., & Seternes, O.-M. (2009). Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19392–19401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023283>
- Accornero, F., Schips, T. G., Petrosino, J. M., Gu, S.-Q., Kanisicak, O., van Berlo, J. H., & Molkentin, J. D. (2017). BEX1 is an RNA-dependent mediator of cardiomyopathy. *Nature Communications*, 8(1), 1875. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02005-1>
- Adams-Cioaba, M. A., Guo, Y., Bian, C. B., Amaya, M. F., Lam, R., Wasney, G. A., Vedadi, M., Xu, C., & Min, J. (2010). Structural Studies of the Tandem Tudor Domains of Fragile X Mental Retardation Related Proteins FXR1 and FXR2. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013559>
- Ahmed, D. S., Isnard, S., Lin, J., Routy, B., & Routy, J.-P. (2021). GDF15/GFRAL Pathway as a Metabolic Signature for Cachexia in Patients with Cancer. *Journal of Cancer*, 12(4), 1125–1132. <https://doi.org/10.7150/jca.50376>
- Al-Qusairi, L., & Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal Muscle*, 1(1), 26. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>
- Almeida, C. F., Martins, P. C., & Vainzof, M. (2016). Comparative transcriptome analysis of muscular dystrophy models Large(myd), Dmd(mdx)/Large(myd) and Dmd(mdx): what makes them different? *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 24(9), 1301–1309. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.16>
- Anastasi, G., Amato, A., Tarone, G., Vita, G., Monici, M. C., Magaudo, L., Brancaccio, M., Sidoti, A., Trimarchi, F., Favaloro, A., & Cutroneo, G. (2003). Distribution and localization of

- vinculin-talin-integrin system and dystrophin-glycoprotein complex in human skeletal muscle. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Cells, Tissues, Organs*, 175(3), 151–164. <https://doi.org/10.1159/000074631>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.003>
- Bakay, M., Zhao, P., Chen, J., & Hoffman, E. P. (2002). A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 12 Suppl 1, S125-41. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(02\)00093-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(02)00093-7)
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Bansal, S. K., Gupta, N., Sankhwar, S. N., & Rajender, S. (2015). Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127007>
- Bárez-López, S., Bosch-García, D., Gómez-Andrés, D., Pulido-Valdeolivas, I., Montero-Pedrazuela, A., Obregon, M. J., & Guadaño-Ferraz, A. (2014). Abnormal motor phenotype at adult stages in mice lacking type 2 deiodinase. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103857>
- Basel, D., & McCarrier, J. (2017). Ending a Diagnostic Odyssey: Family Education, Counseling, and Response to Eventual Diagnosis. *Pediatric Clinics of North America*, 64(1), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.08.017>
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H., & Muntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews*, 80(3), 1215–1265. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>

- Biressi, S., Bjornson, C. R. R., Carlig, P. M. M., Nishijo, K., Keller, C., & Rando, T. A. (2013). Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells. *Developmental Biology*, 379(2), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.021>
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294(5), 1351–1362. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>
- Blom, Nikolaj, Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., Maurer, M., Guillaud, L., Prola, A., Ferry, A., Aubin-Houzelstein, G., Demarquoy, J., Relaix, F., Piercy, R. J., Blot, S., ... Pilot-Storck, F. (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(5), 429–440. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv049>
- Boivin, B., Khairallah, M., Cartier, R., & Allen, B. G. (2012). Characterization of hsp27 kinases activated by elevated aortic pressure in heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 371(1–2), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1420-x>
- Brand, F., Schumacher, S., Kant, S., Menon, M. B., Simon, R., Turgeon, B., Britsch, S., Meloche, S., Gaestel, M., & Kotlyarov, A. (2012). The extracellular signal-regulated kinase 3 (mitogen-activated protein kinase 6 [MAPK6])-MAPK-activated protein kinase 5 signaling complex regulates septin function and dendrite morphology. *Molecular and Cellular Biology*, 32(13), 2467–2478. <https://doi.org/10.1128/MCB.06633-11>
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., & Bredt, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82(5), 743–752. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90471-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90471-9)
- Bricceno, K. V., Martinez, T., Leikina, E., Duguez, S., Partridge, T. A., Chernomordik, L. V., Fischbeck, K. H., Sumner, C. J., & Burnett, B. G. (2014). Survival motor neuron protein deficiency impairs myotube formation by altering myogenic gene expression and focal adhesion dynamics. *Human Molecular Genetics*, 23(18), 4745–4757.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu189>

- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00031-10>
- Carrell, E. M., Coppola, A. R., McBride, H. J., & Dirksen, R. T. (2016). Orail enhances muscle endurance by promoting fatigue-resistant type I fiber content but not through acute store-operated Ca²⁺ entry. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(12), 4109–4119. <https://doi.org/10.1096/fj.201600621R>
- Carson, J. A., Nettleton, D., & Reecy, J. M. (2002). Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(2), 207–209. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0544fje>
- Casey, W. M., Brodie, T., Yoon, L., Ni, H., Jordan, H. L., & Cariello, N. F. (2008). Correlation analysis of gene expression and clinical chemistry to identify biomarkers of skeletal myopathy in mice treated with PPAR agonist GW610742X. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 13(4), 364–376. <https://doi.org/10.1080/13547500801903545>
- Chen, G., Hitomi, M., Han, J., & Stacey, D. W. (2000). The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 38973–38980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002856200>
- Chin, L., Olzmann, J., & Li, L. (2008). Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. *Current Medicinal Chemistry*, 15(1), 47–60. <https://doi.org/10.2174/092986708783330692>
- Choi, J. H., Choi, D.-K., Sohn, K.-C., Kwak, S. S., Suk, J., Lim, J.-S., Shin, I., Kim, S.-W., Lee, J.-H., & Joe, C. O. (2012). Absence of a human DnaJ protein hTid-1S correlates with aberrant actin cytoskeleton organization in lesional psoriatic skin. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 25954–25963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.313809>
- Chu, M., Novak, S. M., Cover, C., Wang, A. A., Chinyere, I. R., Juneman, E. B., Zarnescu, D. C., Wong, P. K., & Gregorio, C. C. (2018). Increased Cardiac Arrhythmogenesis Associated with

- Gap Junction Remodeling with Upregulation of RNA-Binding Protein FXR1. *Circulation*, 137(6), 605–618. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028976>
- Claeys, K. G. (2020). Congenital myopathies: an update. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 62(3), 297–302. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14365>
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., & Gregorio, C. C. (2002). Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 637–706. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840>
- Clarke, N. F., & North, K. N. (2003). Congenital Fiber Type Disproportion—30 Years On. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(10), 977–989. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.10.977>
- Clowes, J. A., Riggs, B. L., & Khosla, S. (2005). The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunological Reviews*, 208, 207–227. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00334.x>
- Consejo, E. L., Uni, D. E. L. A., Oficial, D., & Europeo, P. (2013). Recomendación del Consejo de 8 de junio de 2009 relativo a una acción en el ámbito de las enfermedades raras. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 2007–2010.
- Coulombe, P., & Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1376–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.001>
- Craig, S. W., & Pardo, J. V. (1983). Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motility*, 3(5–6), 449–462. <https://doi.org/10.1002/cm.970030513>
- Davidovic, L., Sacconi, S., Bechara, E. G., Delplace, S., Allegra, M., Desnuelle, C., & Bardoni, B. (2008). Alteration of expression of muscle specific isoforms of the fragile X related protein 1 (FXR1P) in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Journal of Medical Genetics*, 45(10), 679–685. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.060541>
- Davidovic, Laetitia, Durand, N., Khalfallah, O., Tabet, R., Barbry, P., Mari, B., Sacconi, S., Moine, H., & Bardoni, B. (2013). A Novel Role for the RNA-Binding Protein FXR1P in Myoblasts Cell-Cycle Progression by Modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA Stability. *PLoS*

- Genetics*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003367>
- De Diego Otero, Y., Severijnen, L.-A., van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B., & Willemsen, R. (2002). Transport of Fragile X Mental Retardation Protein via Granules in Neurites of PC12 Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), 8332–8341. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.23.8332-8341.2002>
- De la Mota-Peynado, A., Chernoff, J., & Beeser, A. (2011). Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13603–13611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181743>
- Deacon, R. M. J. (2013). Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 76, 1–4. <https://doi.org/10.3791/2610>
- Délérís, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.-L., & Meloche, S. (2008). Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocation of MK5. *Journal of Cellular Physiology*, 217(3), 778–788. <https://doi.org/10.1002/jcp.21560>
- Délérís, P., Trost, M., Topisirovic, I., Tanguay, P.-L., Borden, K. L. B., Thibault, P., & Meloche, S. (2011). Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6470–6478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181529>
- Desmond, P. F., Labuza, A., Muriel, J., Markwardt, M. L., Mancini, A. E., Rizzo, M. A., & Bloch, R. J. (2017). Interactions between small ankyrin 1 and sarcolipin coordinately regulate activity of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA1). *The Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 10961–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783613>
- Dindot, S. V., Antalffy, B. A., Bhattacharjee, M. B., & Beaudet, A. L. (2008). The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Human Molecular Genetics*, 17(1), 111–118. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm288>
- Dirksen, R. T. (2009). Coupling in Skeletal Muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3), 389–395. <https://doi.org/10.1139/h09-044>
- Dubé, M., Huot, M. E., & Khandjian, E. W. (2000). Muscle specific fragile X related protein 1

- isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. *BMC Genetics*, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-1-4>
- Eisner, V., Csordás, G., & Hajnóczky, G. (2013). Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle-pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signaling. *Journal of Cell Science*, 126(14), 2965–2978. <https://doi.org/10.1242/jcs.093609>
- Engels, B., Van't Padje, S., Blonden, L., Severijnen, L. A., Oostra, B. A., & Willemsen, R. (2004). Characterization of Fxr1 in *Danio rerio*; a simple vertebrate model to study costamere development. *Journal of Experimental Biology*, 207(19), 3329–3338. <https://doi.org/10.1242/jeb.01146>
- Estañ, M. C., Fernández-Núñez, E., Zaki, M. S., Esteban, M. I., Donkervoort, S., Hawkins, C., Caparros-Martin, J. A., Saade, D., Hu, Y., Bolduc, V., Chao, K. R.-Y., Nevado, J., Lamuedra, A., Largo, R., Herrero-Beaumont, G., Regadera, J., Hernandez-Chico, C., Tizzano, E. F., Martinez-Glez, V., ... Ruiz-Perez, V. L. (2019). Recessive mutations in muscle-specific isoforms of FXR1 cause congenital multi-minicore myopathy. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08548-9>
- Feher, J. (2017). 3.5 - *Contractile Mechanisms in Skeletal Muscle* (J. B. T.-Q. H. P. (Second E. Feher (ed.); pp. 305–317). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00028-8>
- Fischer, M., Kaeck, S., Knutti, D., & Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20(5), 847–854. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80467-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80467-5)
- Fourest-lieuvain, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-gallay, K., & Rossi, D. (2007). *Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad*. <https://doi.org/10.1242/jcs.100958>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fusto, A., Moyle, L. A., Gilbert, P. M., & Pegoraro, E. (2019). Cored in the act: The use of models to understand core myopathies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(12). <https://doi.org/10.1242/dmm.041368>
- Gabellini, D., D'Antona, G., Moggio, M., PELLE, A., Zecca, C., Adami, R., Angeletti, B., Ciscato, P., Pellegrino, M. A., Bottinelli, R., Green, M. R., & Tupler, R. (2006). Facioscapulohumeral

- muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature*, 439(7079), 973–977. <https://doi.org/10.1038/nature04422>
- Gaestel, M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - Two's company, three's a crowd. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 120–130. <https://doi.org/10.1038/nrm1834>
- Gerits, N., Mikalsen, T., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M., & Moens, U. (2007). Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 37232–37243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704873200>
- Gerits, N., Shiryaev, A., Kostenko, S., Klenow, H., Shiryaeva, O., Johannessen, M., & Moens, U. (2009). The transcriptional regulation and cell-specific expression of the MAPK-activated protein kinase MK5. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 14(4), 548–574. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0020-6>
- Grabner, M., & Dayal, A. (2010). Crosstalk via the Sarcoplasmic Gap. The DHPR-RyR Interaction. In *Current Topics in Membranes* (1st ed., Vol. 66, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(10\)66006-1](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(10)66006-1)
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*.
- Hansen, C. A., Bartek, J., & Jensen, S. (2008). A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(3), 325–334. <https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5354>
- Hefner, Y., Borsch-Haubold, A. G., Murakami, M., Wilde, J. I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J. R. 3rd, Armstrong, C. G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S. P., & Gelb, M. H. (2000). Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37542–37551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003395200>
- Horn, D., Fernández-Núñez, E., Gomez-Carmona, R., Rivera-Barahona, A., Nevado, J., Schwartzmann, S., Ehmke, N., Lapunzina, P., Otaify, G. A., Temtamy, S., Aglan, M., Boschann, F., & Ruiz-Perez, V. L. (2021). Biallelic truncating variants in MAPKAPK5 cause a new developmental disorder involving neurological, cardiac, and facial anomalies combined with synpolydactyly. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01052-2>

- Huot, M.-E. (2001). Developmental expression of the fragile X-related 1 proteins in mouse testis: association with microtubule elements. *Human Molecular Genetics*, 10(24), 2803–2811. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.24.2803>
- Huot, Marc-Etienne, Bisson, N., Davidovic, L., Mazroui, R., Labelle, Y., Moss, T., & Khandjian, E. W. (2005). The RNA-binding protein fragile X-related 1 regulates somite formation in *Xenopus laevis*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9), 4350–4361. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0304>
- Jaka, O., Casas-Fraile, L., Lopez de Munain, A., & Saenz, A. (2015). Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17, e12. <https://doi.org/10.1017/erm.2015.9>
- Jost, C. A., Marin, M. C., & Kaelin, W. G. J. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389(6647), 191–194. <https://doi.org/10.1038/38298>
- Jungbluth, H., Sewry, C. A., & Muntoni, F. (2011). Core myopathies. *Seminars in Pediatric Neurology*, 18(4), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.005>
- Jurney, M. J., Xia, R., Mackrill, J. J., Gunther, D., Crawford, T., Flanigan, K. M., Abramson, J. J., Howard, M. T., & Grunwald, D. J. (2008). Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12485–12490. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806015105>
- Kaisto, T., & Metsikko, K. (2003). Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Experimental Cell Research*, 289(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(03\)00231-3](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(03)00231-3)
- Kant, S., Schumacher, S., Singh, M. K., Kispert, A., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2006). Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35511–35519. <https://doi.org/10.1074/jbc.m606693200>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ...

- MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kassouf, T., & Sumara, G. (2020). Impact of conventional and atypical maps on the development of metabolic diseases. *Biomolecules*, 10(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/biom10091256>
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of Cell Biology*, 147(7), 1431–1442. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1431>
- Khandjian, E. (1998). Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Human Molecular Genetics*, 7(13), 2121–2128. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.2121>
- Kirkpatrick, L. L., McIlwain, K. A., & Nelson, D. L. (1999). Alternative splicing in the murine and human FXR1 genes. *Genomics*, 59(2), 193–202. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5868>
- Kirkpatrick, L. L., McIlwain, K. A., & Nelson, D. L. (2001). Comparative genomic sequence analysis of the FXR gene family: FMR1, FXR1, and FXR2. *Genomics*, 78(3), 169–177. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6667>
- Klevernic, I. V., Stafford, M. J., Morrice, N., Pegg, M., Morton, S., & Cohen, P. (2006). Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *The Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 365–373. <https://doi.org/10.1042/BJ20051288>
- Knebel, A., Haydon, C. E., Morrice, N., & Cohen, P. (2002). Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 2), 525–532. <https://doi.org/10.1042/BJ20020916>
- Koboldt, D. C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D. E., McLellan, M. D., Mardis, E. R., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., & Ding, L. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(17), 2283–2285. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp373>
- Kosmas, K., Eskandarnaz, A., Khorsandi, A. B., Kumar, A., Ranjan, R., Eming, S. A., Noegel, A. A., & Peche, V. S. (2015). CAP2 is a regulator of the actin cytoskeleton and its absence changes infiltration of inflammatory cells and contraction of wounds. *European Journal of Cell Biology*, 94(1), 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.10.004>

- Kostenko, S., Dumitriu, G., Lægreid, K. J., & Moens, U. (2011). Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase. *World Journal of Biological Chemistry*, 2(5), 73–89. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i5.73>
- Kostenko, S., Dumitriu, G., & Moens, U. (2012). Tumour promoting and suppressing roles of the atypical MAP kinase signalling pathway ERK3/4-MK5. *Journal of Molecular Signaling*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-7-9>
- Kostenko, S., Johannessen, M., & Moens, U. (2009). PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cellular Signalling*, 21(5), 712–718. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.009>
- Kostenko, S., Shiryaev, A., Gerits, N., Dumitriu, G., Klenow, H., Johannessen, M., & Moens, U. (2011). Serine residue 115 of MAPK-activated protein kinase MK5 is crucial for its PKA-regulated nuclear export and biological function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(5), 847–862. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0496-2>
- Kress, T. R., Cannell, I. G., Brenkman, A. B., Samans, B., Gaestel, M., Roepman, P., Burgering, B. M., Bushell, M., Rosenwald, A., & Eilers, M. (2011). The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Molecular Cell*, 41(4), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.023>
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiological Reviews*, 92(2), 689–737. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Laure, L., Suel, L., Roudaut, C., Bourg, N., Ouali, A., Bartoli, M., Richard, I., & Danièle, N. (2009). Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *The FEBS Journal*, 276(3), 669–684. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06814.x>
- Lewelt, A., Newcomb, T. M., & Swoboda, K. J. (2012). New therapeutic approaches to spinal muscular atrophy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(1), 42–53. <https://doi.org/10.1007/s11910-011-0240-9>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Subgroup, 1000 Genome Project Data Processing. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

- Li, X., Baker, J., Cracknell, T., Haynes, A. R., & Blanco, G. (2017). IGFN1_v1 is required for myoblast fusion and differentiation. *PLoS ONE*, 12(6), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180217>
- Liewluck, T., Milone, M., Tian, X., Engel, A. G., Staff, N. P., & Wong, L.-J. (2016). Adult-onset respiratory insufficiency, scoliosis, and distal joint hyperlaxity in patients with multiminicore disease due to novel Megf10 mutations. *Muscle & Nerve*, 53(6), 984–988. <https://doi.org/10.1002/mus.25054>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luther, P. K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 30(5–6), 171–185. <https://doi.org/10.1007/s10974-009-9189-6>
- Maggi, L., Scoto, M., Cirak, S., Robb, S. A., Klein, A., Lillis, S., Cullup, T., Feng, L., Manzur, A. Y., Sewry, C. A., Abbs, S., Jungbluth, H., & Muntoni, F. (2013). Congenital myopathies--clinical features and frequency of individual subtypes diagnosed over a 5-year period in the United Kingdom. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 23(3), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.01.004>
- Majumder, M., House, R., Palanisamy, N., Qie, S., Day, T. A., Neskey, D., Diehl, J. A., & Palanisamy, V. (2016a). RNA-Binding Protein FXR1 Regulates p21 and TERC RNA to Bypass p53-Mediated Cellular Senescence in OSCC. *PLoS Genetics*, 12(9), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006306>
- Majumder, M., House, R., Palanisamy, N., Qie, S., Day, T. A., Neskey, D., Diehl, J. A., & Palanisamy, V. (2016b). RNA-Binding Protein FXR1 Regulates p21 and TERC RNA to Bypass p53-Mediated Cellular Senescence in OSCC. *PLoS Genetics*, 12(9), e1006306. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006306>
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Boilard, N., Labelle, Y., & Khandjian, E. W. (2003). Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. *Human Molecular Genetics*, 12(23), 3087–3096. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg335>
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., & Khandjian, E. W. (2002).

- Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Human Molecular Genetics*, 11(24), 3007–3017. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3007>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Meintjes, E. J., Willemsen, R., Kirkpatrick, L. L., Niuewenhuizen, I. M., Hoogeveen-Westerveld, M., Verweij, M., Reis, S., Bardoni, B., Hoogeveen, A. T., Oostra, B. A., & Nelson, D. L. (2004). Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: Implications for Fxr1p function in vivo. *Human Molecular Genetics*, 13(13), 1291–1302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh150>
- Moens, U., & Kostenko, S. (2012). Hsp27 Phosphorylation Patterns and Cellular Consequences. In B. Henderson & A. G. Pockley (Eds.), *Cellular Trafficking of Cell Stress Proteins in Health and Disease* (pp. 43–74). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4740-1_4
- Moens, U., & Kostenko, S. (2013). Structure and function of MK5/PRAK: the loner among the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases. *Biological Chemistry*, 394(9), 1115–1132. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0149>
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., & Taylor, J. P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, 163(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 12(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Müller, M., Schleithoff, E. S., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P. H., & Schilling, T. (2006). One, two, three-p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resistance Updates*, 9(6), 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.01.001>
- Nagy, E., & Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing

- genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), 198–199. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01208-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01208-0)
- Nakada, C., Oka, A., Nonaka, I., Sato, K., Mori, S., Ito, H., & Moriyama, M. (2003). Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathology International*, 53(10), 653–658. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2003.01541.x>
- Nakada, C., Tsukamoto, Y., Oka, A., Nonaka, I., Takeda, S., Sato, K., Mori, S., Ito, H., & Moriyama, M. (2003). Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 83(5), 711–719. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000067484.35298.1a>
- Nakamura, K., Nakada, C., Takeuchi, K., Osaki, M., Shomori, K., Kato, S., Ohama, E., Sato, K., Fukayama, M., Mori, S., Ito, H., & Moriyama, M. (n.d.). Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 70(4), 197–203. <https://doi.org/10.1159/000069329>
- Naldaiz-Gastesi, N., Goicoechea, M., Alonso-Martin, S., Aiastui, A., Lopez-Mayorga, M., Garcia-Belda, P., Lacalle, J., San Jose, C., Arauzo-Bravo, M. J., Trouilh, L., Anton-Leberre, V., Herrero, D., Matheu, A., Bernad, A., Garcia-Verdugo, J. M., Carvajal, J. J., Relaix, F., Lopez de Munain, A., Garcia-Parra, P., & Izeta, A. (2016). Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 7(3), 411–424. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.002>
- Nance, J. R., Dowling, J. J., Gibbs, E. M., & Bönnemann, C. G. (2012). Congenital myopathies: An update. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0255-x>
- Nawaito, S. A., Dingar, D., Sahadevan, P., Hussein, B., Sahmi, F., Shi, Y., Gillis, M. A., Gaestel, M., Tardif, J. C., & Allen, B. G. (2017). Mk5 haplodeficiency attenuates hypertrophy and preserves diastolic function during remodeling induced by chronic pressure overload in the mouse heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(1), H46–H58. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00597.2016>
- Nawaito, S. A., Sahadevan, P., Clavet-Lanthier, M.-É., Pouliot, P., Sahmi, F., Shi, Y., Gillis, M.-A.,

- Lesage, F., Gaestel, M., Sirois, M. G., Calderone, A., Tardif, J.-C., & Allen, B. G. (2019). MK5 haplodeficiency decreases collagen deposition and scar size during post-myocardial infarction wound repair. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(6), H1281–H1296. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2017>
- Nawaito, S. A., Sahadevan, P., Sahmi, F., Gaestel, M., Calderone, A., & Allen, B. G. (2019). Transcript levels for extracellular matrix proteins are altered in MK5-deficient cardiac ventricular fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 132, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.014>
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C., & Han, J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *The EMBO Journal*, 17(12), 3372–3384. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3372>
- New, L., Jiang, Y., & Han, J. (2003). Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6), 2603–2616. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0538>
- Ni, H., Wang, X. S., Diener, K., & Yao, Z. (1998). MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(2), 492–496. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8135>
- North, K. N., Wang, C. H., Clarke, N., Jungbluth, H., Vainzof, M., Dowling, J. J., Amburgey, K., Quijano-Roy, S., Beggs, A. H., Sewry, C., Laing, N. G., Bönnemann, C. G., Aloysius, A., Apkon, S., Bellini, J., Bertini, E., Biancalana, V., Birnkrant, D., Bushby, K., ... Yuan, N. (2014). Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscular Disorders*, 24(2), 97–116. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.11.003>
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., & MacLennan, D. H. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12360–12369. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12360>
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2646–2651.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0708519105>

- Osseni, A., Sébastien, M., Sarrault, O., Baudet, M., Couté, Y., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A., & Marty, I. (2016). Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *Journal of Cell Science*, 129(20), 3744–3755. <https://doi.org/10.1242/jcs.188862>
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., & Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 111(4), 1097–1107.
- Palencia-Campos, A., Ullah, A., Nevado, J., Yildirim, R., Unal, E., Ciorraga, M., Barruz, P., Chico, L., Piceci-Sparascio, F., Guida, V., De Luca, A., Kayserili, H., Ullah, I., Burmeister, M., Lapunzina, P., Ahmad, W., Morales, A. V., & Ruiz-Perez, V. L. (2017). GLI1 inactivation is associated with developmental phenotypes overlapping with Ellis-van Creveld syndrome. *Human Molecular Genetics*, 26(23), 4556–4571. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx335>
- Park, S. Y., Yun, Y., Lim, J. S., Kim, M. J., Kim, S. Y., Kim, J. E., & Kim, I. S. (2016). Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10871>
- Pasut, A., Jones, A. E., & Rudnicki, M. A. (2013). Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 73, e50074. <https://doi.org/10.3791/50074>
- Patel, M. S., Lee, J., Baz, M., Wells, C. E., Bloch, S., Lewis, A., Donaldson, A. V., Garfield, B. E., Hopkinson, N. S., Natanek, A., Man, W. D.-C., Wells, D. J., Baker, E. H., Polkey, M. I., & Kemp, P. R. (2016). Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7(4), 436–448. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12096>
- Perander, M., Åberg, E., Johansen, B., Dreyer, B., Guldvik, I. J., Outzen, H., Keyse, S. M., & Seternes, O.-M. (2008). The Ser186 phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *Biochemical Journal*, 411(3), 613–622. <https://doi.org/10.1042/BJ20071369>
- Perander, M., Al-Mahdi, R., Jensen, T. C., Nunn, J. A. L., Kildalsen, H., Johansen, B., Gabrielsen, M., Keyse, S. M., & Seternes, O.-M. (2017). Regulation of atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 by the phosphatase DUSP2. *Scientific Reports*, 7(1), 43471.

<https://doi.org/10.1038/srep43471>

- Perander, M., Keyse, S. M., & Seternes, O.-M. (2008). Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 4617–4624. <https://doi.org/10.2741/3027>
- Persaud, A., Alberts, P., Amsen, E. M., Xiong, X., Wasmuth, J., Saadon, Z., Fladd, C., Parkinson, J., & Rotin, D. (2009). Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays. *Molecular Systems Biology*, 5, 333. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.85>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). Biochimica et Biophysica Acta The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Porter, J. D., Khanna, S., Kaminski, H. J., Rao, J. S., Merriam, A. P., Richmonds, C. R., Leahy, P., Li, J., Guo, W., & Andrade, F. H. (2002). A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Human Molecular Genetics*, 11(3), 263–272. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.3.263>
- Putten, M. Van. (2016). The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time. *Id*, 1–12. TREAT-NMD SOP 2014;DMD_M.2.1.004:<http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/dmd-sops/>
- Qian, J., Hassanein, M., Hoeksema, M. D., Harris, B. K., Zou, Y., Chen, H., Lu, P., Eisenberg, R., Wang, J., Espinosa, A., Ji, X., Harris, F. T., Rahman, S. M. J., & Massion, P. P. (2015). The RNA binding protein FXR1 is a new driver in the 3q26-29 amplicon and predicts poor prognosis in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3469–3474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421975112>
- Rai, A. K., Chen, J.-X., Selbach, M., & Pelkmans, L. (2018). Kinase-controlled phase transition of membraneless organelles in mitosis. *Nature*, 559(7713), 211–216. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0279-8>
- Roman-Blas, J. A., Mediero, A., Tardio, L., Portal-Nunez, S., Gratal, P., Herrero-Beaumont, G., & Largo, R. (2017). The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an

- experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *European Journal of Pharmacology*, 794, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.015>
- Ronkina, N., Johansen, C., Bohlmann, L., Lafera, J., Menon, M. B., Tiedje, C., Laaß, K., Turk, B. E., Iversen, L., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2015). Comparative Analysis of Two Gene-Targeting Approaches Challenges the Tumor-Suppressive Role of the Protein Kinase MK5/PRAK. *PLoS One*, 10(8), e0136138–e0136138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136138>
- Sahadevan, P., & Allen, B. G. (2017). MK5: A novel regulator of cardiac fibroblast function? *IUBMB Life*, 69(10), 785–794. <https://doi.org/10.1002/iub.1677>
- Salemi, L. M., Almawi, A. W., Lefebvre, K. J., & Schild-Poulter, C. (2014). Aggresome formation is regulated by RanBPM through an interaction with HDAC6. *Biology Open*, 3(6), 418 LP – 430. <https://doi.org/10.1242/bio.20147021>
- Schartner, V., Romero, N. B., Donkervoort, S., Treves, S., Munot, P., Pierson, T. M., Dabaj, I., Malfatti, E., Zaharieva, I. T., Zorzato, F., Abath Neto, O., Brochier, G., Lornage, X., Eymard, B., Taratuto, A. L., Böhm, J., Gonorazky, H., Ramos-Platt, L., Feng, L., ... Laporte, J. (2017). Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. *Acta Neuropathologica*, 133(4), 517–533. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1656-8>
- Schmalbruch, H., & Lewis, D. M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle & Nerve*, 23(4), 617–626. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(200004\)23:4<617::aid-mus22>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(200004)23:4<617::aid-mus22>3.0.co;2-y)
- Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *The EMBO Journal*, 23(24), 4770–4779. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600467>
- Seo, J., Kim, M. H., Hong, H., Cho, H., Park, S., Kim, S. K., & Kim, J. (2019). MK5 Regulates YAP Stability and Is a Molecular Target in YAP-Driven Cancers. *Cancer research*, 79(24), 6139–6152. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1339>
- Serratrice, G. (2009). Building muscle. *Joint Bone Spine*, 76(4), 324–326. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.03.007>
- Seternes, O.-M., Mikalsen, T., Johansen, B., Michaelsen, E., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Turgeon, B., Meloche, S., Moens, U., & Keyse, S. M. (2004). Activation of MK5/PRAK by

- the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *The EMBO Journal*, 23(24), 4780–4791. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600489>
- Seternes, O. M., Johansen, B., Hegge, B., Johannessen, M., Keyse, S. M., & Moens, U. (2002). Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20), 6931–6945. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.20.6931-6945.2002>
- Shea, C. A., Rolfe, R. A., & Murphy, P. (2015). The importance of foetal movement for co-ordinated cartilage and bone development in utero: Clinical consequences and potential for therapy. *Bone and Joint Research*, 4(7), 105–116. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.47.2000387>
- Shi, Y., Kotlyarov, A., Laabeta, K., Gruber, A. D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H. E., Friedrich, A., Volk, H.-D., & Gaestel, M. (2003). Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7732–7741. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7732-7741.2003>
- Shiryaev, A., Kostenko, S., Dumitriu, G., & Moens, U. (2012). Septin 8 is an interaction partner and in vitro substrate of MK5. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(5), 98–109. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i5.98>
- Shiryaev, A., & Moens, U. (2010). Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: Ménage à trois or ménage à quatre? *Cellular Signalling*, 22(8), 1185–1192. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.002>
- Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H., & Dreyfuss, G. (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7), 3825–3832. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3825>
- Smith, J. A., Curry, E. G., Blue, R. E., Roden, C., Dundon, S. E. R., Rodríguez-Vargas, A., Jordan, D. C., Chen, X., Lyons, S. M., Crutchley, J., Anderson, P., Horb, M. E., Gladfelter, A. S., & Giudice, J. (2020). FXR1 splicing is important for muscle development and biomolecular condensates in muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 219(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.201911129>
- Soares, R. J., Maglieri, G., Gutschner, T., Diederichs, S., Lund, A. H., Nielsen, B. S., & Holmstrøm,

- K. (2018). Evaluation of fluorescence in situ hybridization techniques to study long non-coding RNA expression in cultured cells. *Nucleic Acids Research*, 46(1), e4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx946>
- Srivastav, R. K., Schwede, S., Klaus, M., Schwermann, J., Gaestel, M., & Niedenthal, R. (2011). Monitoring protein-protein interactions in mammalian cells by trans-SUMOylation. *The Biochemical Journal*, 438(3), 495–503. <https://doi.org/10.1042/BJ20110035>
- Stern-Straeter, J., Bran, G., Riedel, F., Sauter, A., Hormann, K., & Goessler, U. R. (2008). Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(1), 49–56.
- Stoecklin, G., & Kedersha, N. (2013). Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 768, 197–211. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5107-5_12
- Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., Dong, M.-Q., Frangou, C. G., Yates, J. R. 3rd, Wright, P. E., & Han, J. (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, 128(2), 295–308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.050>
- Suzuki, N., Aoki, M., Hinuma, Y., Takahashi, T., Onodera, Y., Ishigaki, A., Kato, M., Warita, H., Tateyama, M., & Itoyama, Y. (2005). Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL). *Neuroscience Research*, 52(1), 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.01.006>
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., & Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, 6, 6. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>
- Tada, T., Simonetta, A., Batterton, M., Kinoshita, M., Edbauer, D., & Sheng, M. (2007). Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Current Biology: CB*, 17(20), 1752–1758. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.039>
- Tajan, M., Paccoud, R., Branka, S., Edouard, T., & Yart, A. (2018). The RASopathy Family:

- Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway. *Endocrine Reviews*, 39(5), 676–700. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00232>
- Tajbakhsh, S. (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 266(4), 372–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x>
- Tak, H., Jang, E., Kim, S. B., Park, J., Suk, J., Yoon, Y. S., Ahn, J. K., Lee, J.-H., & Joe, C. O. (2007). 14-3-3epsilon inhibits MK5-mediated cell migration by disrupting F-actin polymerization. *Cellular Signalling*, 19(11), 2379–2387. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.07.016>
- Tamanini, F. (2000). The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. *Human Molecular Genetics*, 9(10), 1487–1493. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.10.1487>
- Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C. E., van Unen, L., Anar, B., Willemsen, R., Yoshida, M., Galjaard, H., Oostra, B. A., & Hoogeveen, A. T. (1999). Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Human Molecular Genetics*, 8(5), 863–869. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.863>
- Tamanini, F., Van Unen, L., Bakker, C., Sacchi, N., Galjaard, H., Oostra, B. A., & Hoogeveen, A. T. (1999). Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 3, 517–523.
- Thevenon, J., Duffourd, Y., Masurel-Paulet, A., Lefebvre, M., Feillet, F., El Chehadeh-Djebbar, S., St-Onge, J., Steinmetz, A., Huet, F., Chouchane, M., Darmency-Stamboul, V., Callier, P., Thauvin-Robinet, C., Faivre, L., & Rivière, J. B. (2016). Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clinical Genetics*, 89(6), 700–707. <https://doi.org/10.1111/cge.12732>
- Toska, K., Kleppe, R., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Cohen, P., & Haavik, J. (2002). Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *Journal of Neurochemistry*, 83(4), 775–783. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01172.x>
- Van't Padje, S., Chaudhry, B., Severijnen, L. A., Van Der Linde, H. C., Mientjes, E. J., Oostra, B. A., & Willemsen, R. (2009). Reduction in fragile X related 1 protein causes cardiomyopathy and muscular dystrophy in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 212(16), 2564–2570.

<https://doi.org/10.1242/jeb.032532>

- Verkerk, A. J., de Graaff, E., De Boulle, K., Eichler, E. E., Konecki, D. S., Reyniers, E., Manca, A., Poustka, A., Willems, P. J., & Nelson, D. L. (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Human Molecular Genetics*, 2(4), 399–404. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.4.399>
- Whitman, S. A., Cover, C., Yu, L., Nelson, D. L., Zarnescu, D. C., & Gregorio, C. C. (2011). Desmoplakin and talin2 are novel mRNA targets of fragile X-related protein-1 in cardiac muscle. *Circulation Research*, 109(3), 262–271. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.244244>
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., & Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 5), 981–992. <https://doi.org/10.1242/jcs.01692>
- Wilding, B. R., McGrath, M. J., Bonne, G., & Mitchell, C. A. (2014). FHL1 mutants that cause clinically distinct human myopathies form protein aggregates and impair myoblast differentiation. *Journal of Cell Science*, 127(10), 2269–2281. <https://doi.org/10.1242/jcs.140905>
- Winge, I., McKinney, J. A., Ying, M., D'Santos, C. S., Kleppe, R., Knappskog, P. M., & Haavik, J. (2008). Activation and stabilization of human tryptophan hydroxylase 2 by phosphorylation and 14-3-3 binding. *The Biochemical Journal*, 410(1), 195–204. <https://doi.org/10.1042/BJ20071033>
- Wippich, F., Bodenmiller, B., Trajkovska, M. G., Wanka, S., Aebersold, R., & Pelkmans, L. (2013). Dual Specificity Kinase DYRK3 Couples Stress Granule Condensation/Dissolution to mTORC1 Signaling. *Cell*, 152(4), 791–805. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.033>
- Witt, C. C., Ono, Y., Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., Granzier, H., & Labeit, S. (2004). Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *Journal of Molecular Biology*, 336(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.12.021>
- Yokoyama, S., & Asahara, H. (2011). The myogenic transcriptional network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(11), 1843–1849. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0629-2>
- Yoshizuka, N., Chen, R. M., Xu, Z., Liao, R., Hong, L., Hu, W.-Y., Yu, G., Han, J., Chen, L., &

- Sun, P. (2012). A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 32(3), 606–618. <https://doi.org/10.1128/MCB.06301-11>
- Yoshizuka, N., Lai, M., Liao, R., Cook, R., Xiao, C., Han, J., & Sun, P. (2012). PRAK suppresses oncogenic ras-induced hematopoietic cancer development by antagonizing the JNK pathway. *Molecular Cancer Research : MCR*, 10(6), 810–820. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0576>
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., & He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Zaika, A. I., & El-Rifai, W. (2006). The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. *Cell Death and Differentiation*, 13(6), 935–940. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401897>
- Zhang, J., Wang, G., He, W.-W., Losh, M., Berry-Kravis, E., & Funk, W. E. (2019). Expression and Characterization of Human Fragile X Mental Retardation Protein Isoforms and Interacting Proteins in Human Cells. *Proteomics Insights*, 10, 1178641818825268. <https://doi.org/10.1177/1178641818825268>
- Zhang, Y., O'Connor, J. P., Siomi, M. C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R. L., & Dreyfuss, G. (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *The EMBO Journal*, 14(21), 5358–5366. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00220.x>
- Zhao, X., & Guan, J.-L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.11.001>
- Zheng, M., Wang, Y.-H., Wu, X.-N., Wu, S.-Q., Lu, B.-J., Dong, M.-Q., Zhang, H., Sun, P., Lin, S.-C., Guan, K.-L., & Han, J. (2011). Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nature Cell Biology*, 13(3), 263–272. <https://doi.org/10.1038/ncb2168>
- Zhou, H., Jungbluth, H., Sewry, C. A., Feng, L., Bertini, E., Bushby, K., Straub, V., Roper, H., Rose, M. R., Brockington, M., Kinali, M., Manzur, A., Robb, S., Appleton, R., Messina, S., D'Amico, A., Quinlivan, R., Swash, M., Müller, C. R., ... Muntoni, F. (2007). Molecular mechanisms

and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 8), 2024–2036. <https://doi.org/10.1093/brain/awm096>

Zvaritch, E., Kraeva, N., Bombardier, E., McCloy, R. A., Depreux, F., Holmyard, D., Kraev, A., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Russell Tupling, A., & MacLennan, D. H. (2009). Ca²⁺ dysregulation in Ryr1I4895T/wt mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores, and nemaline rods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21813–21818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912126106>



ANEXO I

TABLAS

Tabla 1. Genes implicados en los diferentes subtipos de miopatía congénita y el tipo de herencia que presentan. AD, autosómico dominante. AR, autosómico recesivo. XR, ligado al X recesivo. Tabla extraída y modificada de Claeys, 2020.

Miopatías congénitas																			
Miopatías con core				Miopatías nemalínicas								Miopatías centronucleares				Miopatía desproporción tipo de fibra		Miopatía almacenamiento de miosina	
Central Core		Multi-minicore		Nemalínica		“Core-bastón”		Cuerpos “Cap”		Cuerpos cebra		Miotubular		Centronuclear		Gen	Herencia	Gen	Herencia
Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia	Gen	Herencia				
<i>RYR</i>	AD, AR	<i>SEPN1</i>	AR	<i>NEB</i>	AR	<i>RYR1</i>	AD, AR	<i>TPM2</i>	AD	<i>ACTA1</i>	AD	<i>MTM1</i>	XR	<i>DNM2</i>	AD	<i>TPM3</i>	AD	<i>MYH7</i>	AD
		<i>RYR</i>	AD, AR	<i>ACTA1</i>	AD, AR	<i>NEB</i>	AR	<i>TPM3</i>	AD					<i>RYR1</i>	AR, AD	<i>RYR1</i>	AR		
		<i>MYH7</i>	AD	<i>TPM3</i>	AD, AR	<i>KBTBD13</i>	AD	<i>ACTA1</i>	AD					<i>BIN1</i>	AR, AD	<i>ACTA1</i>	AD		
		<i>TTN</i>	AR	<i>TPM2</i>	AD, AR	<i>CFL2</i>	AR	<i>NEB</i>	AR					<i>MYF6</i>	AD	<i>TPM2</i>	AD		
		<i>ACTA1</i>	AD	<i>RYR1</i>	AR			<i>MYPD</i>	AR					<i>CCDC78</i>	AD	<i>SEPN1</i>	AR		
		<i>MEGF10</i>	AR	<i>TNNT1</i>	AR									<i>TTN</i>	AR	<i>MYL2</i>	AR		
		<i>CCDC78</i>	AD	<i>CFL2</i>	AR									<i>SPEG</i>	AR	<i>HACD1</i>	AR		
		<i>ACTN2</i>	AD	<i>KBTBD13</i>	AD									<i>ZAK</i>	AR	<i>MYH7</i>	AD		
		<i>SECISBP2</i>	AR	<i>KLHL40</i>	AR									<i>CACNA1S</i>	AD, AR	<i>TTN</i>	AR		
		<i>CACNA1S</i>	AD, AR	<i>KLHL41</i>	AR											<i>SCN4A</i>	AR		
				<i>LMOD3</i>	AR														
				<i>MYPD</i>	AR														
				<i>RYR3</i>	AR														

Tabla 2. Sustratos de MK5 *in vitro* e *in vivo*. Los residuos idénticos al motivo consenso de fosforilación por MK5, LxRxxS, están subrayados, y el sitio fosfoaceptor en dicho motivo está en negrita. Tabla extraída y modificada de Moens and Kostenko 2013. Abreviaturas Y2H: yeast two-hybrid, n.d.: no determinado

Sustrato	Función	<i>In vitro</i> o <i>in vivo</i>	Motivo de fosforilación	Residuos de MK5 requeridos para la interacción	Referencia
14-3-3ε	Proteína reguladora	<i>In vivo</i>	No hay fosforilación	Dominio Nt	Tak et al. 2007
ATP1b1	ATPasa	<i>In vitro</i> (Y2H)	n.d.	n.d.	Brand et al. 2012
Aglutinante de RhoGTPasa 2 (Borg2)	Proteína de unión a GTPasa	<i>In vitro</i>	n.d.	n.d.	Brand et al. 2012
Aglutinante de RhoGTPasa 2 (Borg3)	Proteína de unión a GTPasa	<i>In vitro</i>	n.d.	n.d.	Brand et al. 2012
Ccar1	Regulador ciclo celular y apoptosis	<i>In vitro</i> (Y2H)	n.d.	n.d.	Brand et al. 2012
Subunidad catalítica de PKA	Proteína quinasa	<i>In vivo</i>	n.d.	C-terminal	Gerits et al. 2007
cPLA2	Fosfolipasa	<i>In vitro</i>	Ser-727: <u>NPSRCSVSLSN</u>	n.d.	Hefner et al. 2000
eEF2 quinasa	Proteína quinasa	<i>In vitro</i>	Ser-377: <u>LLRPLSENSGD</u>	n.d.	Knebel et al. 2002
ERK3	MAPK	<i>In vivo</i>		383-393	Aberg et al. 2009
ERK4	MAPK	<i>In vivo</i>		460-465	Aberg et al. 2009
FOXO3a	Factor de transcripción	<i>In vivo</i>	Ser-215: <u>IRHNLSLHSRF</u> Ser-253: <u>RRRAVSMDNSN</u> Ser-551: <u>GSRALSNSVSN</u> Ser-555: <u>LSNSVSNMGLS</u>	n.d.	Kress et al. 2011
GLUT4	Transportador de glucosa	<i>In vitro</i>	n.d.	n.d.	Poon, 2004
HSF1	Factor de transcripción	<i>In vitro</i>	n.d.	n.d.	Moens & Kostenko, resultados sin publicar
HSP27		<i>In vivo</i>	Ser-15: <u>LLRGPSWDPFR</u> Ser-78: <u>YSRALSRQLSS</u> Ser-82: <u>SSRQLSSGVSEI</u>	n.d.	Kostenko et al. 2009
HSP40	Chaperona	<i>In vivo</i>	Ser-149: <u>VNFGRSRSAQ</u> Ser-151: <u>FGRSRSAQEP</u> Ser-171: <u>HDLRVSLEEIY</u>	n.d.	Moens & Kostenko, resultados sin publicar
hTid ₄	Proteína antiapoptótica	<i>In vivo</i>	No hay fosforilación	n.d.	Choi et al. 2012
Kalirin-7	Factor intercambiador de nucleótidos	<i>In vivo</i>	Ser-478: <u>LQRPLSPGNSE</u>	n.d.	Brand et al. 2012
Cadena ligera de la miosina II	Contracción muscular	<i>In vitro</i>	Ser-19: <u>PQRATSNVFAM</u>	n.d.	Ni et al. 1998
MK2	MAPKAPK	<i>In vivo</i>	n.d.	n.d.	Srivastav et al. 2011
Nedd4	E3 ligasa	<i>In vivo</i>	n.d.	n.d.	Persaud et al. 2009
p53	Supresor de tumores	<i>In vivo</i>	Ser-37: <u>LSPLPSQAMDD</u>	n.d.	Sun et al. 2007
PRAKtide	Péptido sintético	<i>In vitro</i>	Ser-8: <u>KKLRRTL</u> SVA	n.d.	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Rheb	GTPasa pequeña	<i>In vivo</i>	Ser-130: <u>MERVISYEEGK</u>	n.d.	Zheng et al. 2011
Septin8	Neurosecreción	<i>In vitro</i>	Ser-242: <u>TPTGHSLKSLD</u> Ser-271: <u>KADTISKSELH</u>	n.d.	Shiryaev et al. 2012 Brand et al. 2012
Tirosina hidroxilasa	Síntesis de catecolaminas	<i>In vitro</i>	Ser-19: <u>GFRRAVSELD</u> AK	n.d.	Toska et al. 2002
Triptófano hidroxilasa humana 2	Síntesis de serotonina	<i>In vitro</i>	n.d.	n.d.	Winge et al. 2008

Tabla 3. Secuencia de pasos de filtrado de variantes utilizada para el análisis de los datos de NGS del probando de la familia 1: MAF: Frecuencia del alelo menos común. ExAC: Exome Aggregation Consortium database; ROH: Región de homocigosidad

Filtro	Número de variantes
Número de variantes codificantes o de splicing y $MAF \leq 0,05$ en 1000 G	5.031
Variantes con un Variant/Depth $\geq 0,2$ (Numero de lecturas con la variante/ Número total de lecturas)	3.802
Variantes con un $MAF < 0,0001$ ("ENSEMBL reléase 75")	1.781
Variantes que no se encuentran en ExAC con $MAF > 0,0001$	600
Número de variantes dentro de una ROH	9

Tabla 4. Variantes candidatas localizadas dentro de una ROH en el probando de la familia 1: las posiciones en los cromosomas están referidas al ensamblaje del genoma humano GRCh37/hg19. Se indican alelos de referencia (Ref) y alternativos (Alt). El programa informático Polyphen se utilizó para predecir el efecto proteico de cada variante. N.P.: sin predecir; PRO: Probablemente; POSS: Posiblemente. (*) Siguiendo las pautas de nomenclatura del HGVS, el nombre correcto de esta variante a nivel de ADNc es: XM_005247813.3: c.1764_1767delACAG y XM_005247815.3: c.1677_1680delACAG para las isoformas e y f respectivamente. (**) La variante homocigótica de cambio de sentido p.I2350V (frecuencia alélica gnomAD: $2.438e-5$) en el gen de la paraplejia espástica *SPG11*, clasificada como benigna por Polyphen, no se detectó en el feto afectado V-4 tras secuenciación Sanger y, por tanto, fue descartada como la causa de la enfermedad en la familia 1. Consistentemente, *SPG11* no fue detectado dentro de una ROH en V-4 (Fig. 12).

Cromosoma	Posición	Ref	Alt	Gen	Efecto proteico	Ensembl protein ID	Predicción Polyphen	OMIM
3	180688933	TAGAC*	T	<i>FXR1</i>	R559Sfs*37	ENSP00000418097.1	N.P.	
11	123887188	G	C	<i>OR10G4</i>	D303H	ENSP00000325076.3	BENIGNA	
15	40849476	G	A	<i>CI5ORF57</i>	R114W	ENSP00000453429.1	PROB PERJUDICIAL	
15	42744067	G	C	<i>ZNF106</i>	Q112E	ENSP00000263805.4	BENIGNA	
15	44856848	T	C	<i>SPG11**</i>	I2350V	ENSP00000261866.7	BENIGNA	602099,616668,604360
20	30513704	G	A	<i>TTLL9</i>	R172Q	ENSP00000365086.2	POSS PERJUDICIAL	
20	39980524	T	A	<i>LPIN3</i>	L389Q	ENSP00000362354.3	PROB PERJUDICIAL	
22	51041662	C	G	<i>MAPK8IP2</i>	S61C	ENSP00000330572.3	BENIGNA	
X	138827973	A	G	<i>ATP11C</i>	Y961H	ENSP00000332756.3	BENIGNA	

Tabla 5. Variantes en genes implicados en miopatías de tipo multi-micore (MAF<0.1): Variantes obtenidas por WES en genes dominantes y recesivos previamente descritos en miopatías multi-micore en el probando de la familia 1 (MAF<0.1). Variantes clasificadas como VUS (variante de significado desconocido), o sin definición en ClinVar (NCBI), y particularmente raras (MAF<0.01%) fueron analizadas por secuenciación Sanger en todos los miembros de la familia 1. Una variante de *TTN* (H23119Y) y la variante W410S en el gen *CCDC78* fueron detectadas en heterocigosis tanto en V-4 como en la madre no afectada. La variante en *CCDC78* implica una variación en un aminoácido no conservado, de la que hay múltiples alelos, siendo uno de ellos W410Stop (MAF=0.00003), que de forma relevante, también estaba presente en la madre no afectada. Además, esta variante se clasifica como sinónimo cuando se utiliza una secuencia de referencia diferente (*rs893572894*, dbSNP database (NCBI)). Chr: cromosoma, Ref: alelo de referencia, Alt: alelo alternativo, Seq Ref: Secuencia de referencia, rs#: número identificativo de la variante, ExAC (MAF): Frecuencia del alelo menos común en ExAC, ClinVar: importancia clínica en la base de datos ClinVar (NCBI). Para variantes multialélicas se indica la MAF de un alelo.

Chr	Posición	Ref	Alt	Gen	Cigotidad	Efecto en la proteína		Seq Ref	rs#	ExAC (MAF)	ClinVar
Genes minicore recesivos							Compartido por V-4 (herencia parental)				
2	179401845	A	G	<i>TTN</i>	Heterocigosis	C33331R		ENSP00000467141.1	<i>rs56061641</i>	G=0.0003	Benign/Likely Benign/VUS
2	179418892	G	A	<i>TTN</i>	Heterocigosis	S29649L	No (paterna)	ENSP00000467141.1	<i>rs764695663</i>	A=0.00003	VUS
2	179441707	G	A	<i>TTN</i>	Heterocigosis	H23119Y	Si, heterocigosis (materna)	ENSP00000467141.1	-	-	-
2	179477267	T	G	<i>TTN</i>	Heterocigosis	N16662T		ENSP00000467141.1	<i>rs36043230</i>	G=0.0160	Benign/Likely benign
2	179578713	T	C	<i>TTN</i>	Heterocigosis	N8891S		ENSP00000467141.1	<i>rs146057575</i>	C=0.0004	Benign/Likely Benign/VUS
12	121176113	A	T	<i>ACADS</i>	Heterocigosis	T219S		ENSP00000242592.4	<i>rs144815059</i>	T=0.0002	-
19	38931451	G	A	<i>RYR1</i>	Heterocigosis	A38T	No (paterna)	ENSP00000347667.3	<i>rs377558801</i>	A=0.00004	VUS
19	38976655	C	T	<i>RYR1</i>	Heterocigosis	P1787L		ENSP00000347667.3	<i>rs34934920</i>	T=0.0196	Benign/Likely benign
19	38983180	G	T	<i>RYR1</i>	Heterocigosis	G2060C		ENSP00000347667.3	<i>rs35364374</i>	T=0.0694	Benign
Genes minicore dominantes											
16	772990	C	G	<i>CCDC78</i>	Heterocigosis	W410S	Si, heterocigosis (materna)	ENSP00000293889.6	<i>rs893572894</i> (multialélica) C/T/G	T (W>Ter) =0.00003	-

Tabla 6: Análisis de Ontología Génica (GO) de enriquecimiento funcional de los genes expresados diferencialmente (DEG) seleccionados en el RNA-seq.

ID	Descripción	GeneRatio	BgRatio	pvalor	p.adjust	geneID	Count
GO:0072331	transducción de señal por mediador de tipo p53	10/217	125/20428	9E-07	0.002	Ankrd1/Bbc3/Cdkn1a/Eda2r/Mdm2/Phlda3/Smyd2/Trp63/Trp73/Zfp385a	10
GO:0042770	transducción de señal en respuesta a daño en el ADN	7/217	73/20428	1E-05	0.006	Ankrd1/Cdkn1a/Mdm2/Smyd2/Trp63/Trp73/Zfp385a	7
GO:0044057	regulación de procesos sistémicos	17/217	483/20428	2E-05	0.007	Adrb1/Camk2d/Cck/Cx3cl1/Dbh/Gas6/Inh1/Kcnh2/Kcnn2/Mdm2/Mstn/Myl4/Nos1/Rapgef4/Sln/Tlr4/Tmem100	17
GO:0001836	liberación de citocromo c de las mitocondrias	6/217	57/20428	3E-05	0.009	Bbc3/Cck/Mmp9/Sfn/Trp73/Wdr35	6
GO:0097193	vía de señalización apoptótica intrínseca	12/217	274/20428	4E-05	0.01	Bbc3/Casp3/Cdkn1a/Eda2r/Mdm2/Mmp9/Phlda3/Scn2a/Sfn/Trp63/Trp73/Zfp385a	12
GO:2001233	regulación de la vía de señalización apoptótica	14/217	382/20428	6E-05	0.012	Atf3/Bbc3/Cx3cl1/Dbh/Gdnf/Mdm2/Mmp9/Tnfrsf22/Tnfrsf23/Trp63/Trp73/Wdr35/Wnt4/Zfp385a	14
GO:0044819	punto de control de transición mitótica G1/S	4/217	21/20428	6E-05	0.012	Cdkn1a/Mdm2/Trp63/Trp73	4
GO:0008015	circulación sanguínea	15/217	444/20428	9E-05	0.013	Acta2/Actc1/Adrb1/Alox12/Camk2d/Cx3cl1/Dbh/Gas6/Kcnh2/Kcnn2/Mdm2/Myl4/Nav2/Nos1/Wdr35	15
GO:0048485	desarrollo del sistema nervioso simpático	4/217	23/20428	9E-05	0.013	Gdnf/Plxna4/Sox11/Trp63	4
GO:0001508	potencial de acción	8/217	136/20428	1E-04	0.013	Camk2d/Gria1/Kcnb1/Kcnh2/Kcnn2/Rapgef4/Scn2a/Scn3a	8
GO:0052646	procesos metabólicos de alditol fosfato	3/217	10/20428	1E-04	0.015	Gpd1/Gpd2/Slc37a2	3
GO:0048483	desarrollo del sistema nervioso autónomo	5/217	47/20428	1E-04	0.015	Gdnf/Nav2/Plxna4/Sox11/Trp63	5
GO:0043491	señalización de proteína quinasa B	8/217	156/20428	3E-04	0.024	AI464131/Cd28/Gas6/Mstn/Phlda3/Ras/Sesn3/Tmem100	8
GO:0030858	regulación positiva de la diferenciación de células epiteliales	5/217	57/20428	3E-04	0.028	Alox12/Foxj1/Gdnf/Sfn/Tmem100	5
GO:0060537	desarrollo de tejido muscular	13/217	408/20428	4E-04	0.033	Actc1/Adrb1/AI464131/Ankrd1/Atf3/Camk2d/Kcnk2/Klf5/Mstn/Rb1/Sox11/Trp63/Trp73	13
GO:0051899	despolarización de membrana	6/217	92/20428	4E-04	0.033	Alox12/Camk2d/Cck/Kcnh2/Scn2a/Scn3a	6
GO:0007599	hemostasis	8/217	176/20428	6E-04	0.04	Alox12/Anxa8/Cx3cl1/Gas6/Myl9/Rab27a/Tlr4/Zfp385a	8
GO:0034764	regulación positiva del transporte transmembrana	7/217	135/20428	6E-04	0.04	Adrb1/Car2/Cxcl10/Kcnh2/Nos1/Slc34a1/Wnk2	7
GO:0006936	contracción muscular	10/217	271/20428	7E-04	0.042	Acta2/Actc1/Adrb1/Camk2d/Gdnf/Kcnh2/Kcnn2/Myh3/Myl4/Nos1	10
GO:0046827	regulación positiva de la exportación de proteínas desde el núcleo	3/217	17/20428	7E-04	0.043	Gas6/Mdm2/Sfn	3
GO:0032715	regulación negativa de la producción de interleuquina-6	4/217	43/20428	0.001	0.058	Foxj1/Gas6/Nlr3/Tlr4	4
GO:0042692	diferenciación de las células musculares	12/217	399/20428	0.001	0.058	Actc1/Adrb1/AI464131/Ankrd1/Camk2d/Cxcl10/Gdf15/Krt8/Lmod2/Mstn/Rb1/Wnt4	12
GO:0019228	potencial de acción neuronal	4/217	45/20428	0.001	0.058	Gria1/Rapgef4/Scn2a/Scn3a	4
GO:0048486	desarrollo del sistema nervioso parasimpático	3/217	21/20428	0.001	0.058	Gdnf/Nav2/Plxna4	3
GO:0003015	procesos cardíacos	8/217	200/20428	0.001	0.058	Actc1/Adrb1/Camk2d/Kcnh2/Kcnn2/Mdm2/Myl4/Nos1	8

Tabla 7: Análisis de enriquecimiento KEGG de DEG seleccionados.

ID	Descripción	GeneRatio	BgRatio	p-valor	p-adjust	q-valor	geneID	Count
mmu04115	vía de señalización p53	7/89	67/7758	1,02539E-05	0,001999505	0,001716175	Bbc3/Casp3/Cdkn1a/Mdm2/Sesn3/Sfn/Trp73	7
mmu05205	proteoglicanos en cáncer	10/89	201/7758	9,32578E-05	0,009092634	0,007804204	Camk2d/Casp3/Cdkn1a/Fzd10/Mdm2/Mmp9/Ras/Tlr4/Wnt11/Wnt4	10

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes portadores de variantes bialélicas en *MAPKAPK5*. Abreviaciones: SD, desviación estándar; LCR, líquido cefalorraquídeo. Tabla extraída y modificada de Horn et al. 2021.

	Persona afectada II-3, Familia 3	Persona afectada II-5, Familia 3	Persona afectada Familia 4
Origen	Egipto	Egipto	Turquía
Sexo	Mujer	Mujer	Hombre
Medidas al nacimiento	Bajo peso (2,200 g a 40 semanas; - 2.71 SD), longitud normal (48 cm; - 0.65 SD) y OFC (32 cm; -1.9 SD)	Peso normal 2,200 g a las 36 semanas. Longitud y OFC por debajo del percentil 5	Peso normal (2,600 g a las 38 semanas; - 1.6 SD), longitud normal (53 cm; + 0.8 SD) y OFC (32.5 cm; - 1.7 SD)
Edad de la última revisión	9 años	2 años y 7 meses	19 meses
OFC	Normal (51 cm; - 0.68 SD)	Microcefalia (44 cm; - 2.71 SD)	Microcefalia (43.5 cm; - 4.3 SD)
Longitud	Baja estatura postnatal (112.5 cm - 3.49 SD)	Baja estatura postnatal (76 cm; - 3.85 SD)	Normal (82.5 cm; - 0.4 SD)
Peso	Fracaso para prosperar (16 kg; - 7.03 SD)	Fracaso para prosperar (10 kg; - 2.41 SD)	Normal (10.8 kg; - 0.6 SD)
Retraso del desarrollo psicomotor	Severo (no camina, solo una palabra a la edad de 9 años)	Severo (no hay control de la cabeza ni habla a los 2 años y 7 meses)	Severo (no se sienta ni habla a la edad de 19 meses)
Anormalidades en el EEG	Hallazgos anormales compatibles con secreción epileptógena generalizada de origen en el lado izquierdo	Hallazgos anormales generalizados	Signos de mayor susceptibilidad a las convulsiones en la región temporooccipital izquierda
Defectos cardiacos	Tetralogía de Fallot	Conducto arterioso persistente (CAP) y comunicación interauricular (CIA)	Defecto cardíaco congénito complejo que incluye ventrículo izquierdo de doble entrada y transposición de grandes arterias
Defectos cerebrales	Hemisferios cerebelosos pequeños, cuarto ventrículo dilatado que se comunica con LCR extraaxial, agujero de Luschka y dilatación de cisterna magna, desmielinización periventricular	Cavum septum pellucidum, dilatación de los ventrículos laterales, cuerpo calloso delgado, folia cerebelosa prominente, hipoplasia vermiana leve, el cuarto ventrículo se comunica con LCR extraaxial	Hipoplasia del cuerpo calloso

	Persona afectada II-3, Familia 3	Persona afectada II-5, Familia 3	Persona afectada Familia 4
Defectos oftalmológicos	Palidez del disco óptico, disfunción de la vía postvisual	Nistagmo	Cataratas, esclerocornea, nistagmo
Discapacidad auditiva	Pérdida moderada de la audición en el rango de alta frecuencia	-	Perdida de audición neurosensorial
Polidactilia postaxial	Simpolidactilia con una falange hipoplásica adicional entre el cuarto y el quinto dígitos, todas las extremidades están afectadas	-	Simpolidactilia con una falange hipoplásica adicional entre el cuarto y quinto dedo del pie derecho
Cráneo	Estrechamiento bitemporal, frente prominente	Estrechamiento bitemporal, frente prominente	-
Cabello y cejas	Escaso	Escaso	-
Fisuras palpebrales	Fisuras palpebrales estrechas	Fisuras palpebrales estrechas	Fisuras palpebrales estrechas
Nariz	Punta nasal sobresaliente prominente	Punta nasal sobresaliente prominente	-
Boca	Labios finos	Labios finos	Labios finos, paladar alto arqueado
Mandíbula	Retrognatia	Retrognatia	Retrognatia
Alteraciones renales	-	Hidroureteronefrosis, reflujo vesicoureteral	-
Variante patogénica MAPKAPK5	Homocigosis c.207_208dupTG; p.Ala70Valfs*7	Homocigosis c.207_208dupTG; p.Ala70Valfs*7	Homocigosis c.1077dupT; p.(Leu360Serfs*21)



ANEXO II

ARTÍCULOS

PUBLICADOS



La realización de esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Primera coautoría. Artículo elegido como “*Editors’ Highlights in Therapeutics*” en la web de la revista de publicación: Estañ MC*, **Fernández-Núñez E***, Zaki MS, Esteban MI, Donkervoort S, Hawkins C, Caparros-Martin JA, Saade D, Hu Y, Bolduc V, Chao KR, Nevado J, Lamuedra A, Largo R, Herrero-Beaumont G, Regadera J, Hernandez-Chico C, Tizzano EF, Martinez-Glez V, Carvajal JJ, Zong R, Nelson DL, Otaify GA, Temtamy S, Aglan M, Issa M, Bönnemann CG, Lapunzina P, Yoon G, Ruiz-Perez VL. Recessive mutations in muscle-specific isoforms of FXR1 cause congenital multi-minicore myopathy. *Nat Commun*. 2019 Feb 15;10(1):797. doi: [10.1038/s41467-019-08548-9](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08548-9). PMID: 30770808; PMCID: PMC6377633.
- Primera coautoría. Horn D*, **Fernández-Núñez E***, Gomez-Carmona R, Rivera-Barahona A, Nevado J, Schwartzmann S, Ehmke N, Lapunzina P, Otaify GA, Temtamy S, Aglan M, Boschann F, Ruiz-Perez VL. Biallelic truncating variants in MAPKAPK5 cause a new developmental disorder involving neurological, cardiac, and facial anomalies combined with synpolydactyly. *Genet Med*. 2021 Jan 13. doi: [10.1038/s41436-020-01052-2](https://doi.org/10.1038/s41436-020-01052-2). Epub ahead of print. PMID: 33442026.

* igual contribución como primera autora.